

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE FRUTAS Y HORTALIZAS
EXPENDIDOS EN LA ZONA METROPOLITANA DE MONTERREY N.L.,
MEDIANTE TECNOLOGÍAS RÁPIDAS”**

Por

Q.F.B. MAYRA ALEJANDRA GÓMEZ GOVEA

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Microbiología.

Agosto 2009

**“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE FRUTAS Y HORTALIZAS
EXPENDIDOS EN LA ZONA METROPOLITANA DE MONTERREY N.L.,
MEDIANTE TECNOLOGÍAS RÁPIDAS”**

Comité de tesis

Director de Tesis: Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Secretario: Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal: Dr. José Santos García Alvarado

El presente trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la dirección de la Dra. Norma L. Heredia R. y la codirección de la Dr. José Santos García A. y el Dr. Juan Francisco Contreras; mediante el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología “Conacyt” y de la compañía bioMerieux®.

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me brindó al otorgarme la beca para realizar mis estudios de Maestría.

A la compañía bioMerieux® por su valiosa contribución para la realización de este trabajo al proporcionar el material para esta investigación.

A la Dra. Norma L. Heredia y al Dr. Santos García por abrirme las puertas de su Laboratorio y darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo.

A mis padres y tíos por brindarme todo su apoyo y fuerza para alcanzar mis objetivos. Sobre todo a mi tía José, por estar siempre al pendiente de mí y creer en mí. A toda mi familia por alentarme en los momentos más difíciles.

A M.C. Luisa Yolanda Solís Soto por su amistad, apoyo, consejos y paciencia que ofreció durante todo mi trabajo de tesis.

A mis compañeros de Laboratorio quienes siempre estuvieron conmigo a lo largo de este largo camino y siempre me brindaron aliento para continuar: M.C. Luisa Yolanda Solís Soto, M.C. Fabiola Venegas, Q.B.P. Nereida Rivera, Aldo Galván, Omar Tovar, Q.B.P. Gabriela Moreno, Mayra Casas, Alma Solís, M.C. Diana Valtierra, M.C. Alejandrina Montes, M.C. Ismael Malagón, Q.F.B. Nydia Orué, M.C. Rosa María Casillas, M.C. Sandra Castillo y M.C. Eduardo Sánchez.

Un agradecimiento muy especial a la persona más importante de mi vida Dios, por mandarme en el camino que era el más adecuado para mí y mantenerme en él, y hacerme entender que esta es mi misión, gracias.

DEDICATORIA

Todo esté largo camino que he recorrido, todo se lo debo a Dios, gracias por todo lo que me haz dado, por el aliento que escuché de ti cuando más lo necesitaba, por hacerme entender que yo estoy aquí con una misión, por hacerme entender que siempre vienen cosas buenas cuando te esfuerzas por ellas, gracias porque mi fe movió montañas, creí en ti y llegue hasta aquí, porque toda ésta experiencia me nutrió de experiencias que jamás pude haberme imaginado vivirlas, porque me enfrente a mis más profundos miedos, a tantos obstáculos que al mirar atrás, veo como los he superado, abrí mi corazón hacia la gente que escuchó y que escuche, capté la esencia de cada persona que conocí, lloré y lloré mucho, pero esas lágrimas no fueron en vano, me mantenían viva, extrañé, valoré todo lo que tengo, la paciencia fue una de las virtudes que surgió en mí. Ante todo, me preparó para abrir mis alas y salir al mundo a volar y siento que lo volvería a repetir cuantas veces fuera necesario. Todo esté esfuerzo te lo dedico a ti Señor porque si no me hubieras dado esta oportunidad de vivirla, no hubiera sido posible que llegaré hasta donde llegué, y que esto sea de inspiración para las otras generaciones de mi familia que vienen de tras de mí, para que vean que si se puede y que pueden alcanzar lo que se propongan.

A mis padres, porque si ellos no me hubieran regalado la vida, no estaría aquí, Gracias mami, por todo tu apoyo, porque esta experiencia nos unió más, por entenderme en todas las cosas que te platicaba, porque también juntas nos acercamos más a Dios y por darme ese aliento que necesitaba, gracias papi por tú apoyo y por tú disciplina que me inculcaste que me ha hecho una persona de bien.

A mi ángel aquí en la tierra que siempre me ha acompañado en toda mi vida, he recorrido muchos caminos con ella, y espero que sean muchos más, que es mi sostén, mi apoyo, y sobretodo que siempre ha creído en mi y seguirá creyendo, que es mi confidente, que me alienta, y lo da todo por mí, gracias, las gracias es muy poco en comparación de todo lo que me has dado, todo tu tiempo lo has invertido en mi desde

que era una niña, siéntete querida porque todo lo que sientes por mí yo también lo siento por ti. Gracias tía José porque yo sé que sin tus consejos no sería la persona que soy ahora, siempre estaré agradecida contigo. Te quiero Muchooooooooooooo.

A mis tíos Alma, Juanis, Magdalena, Javier, porque ellos siempre estuvieron al pendiente de mí, y desde pequeña, han estado a mi lado en todos los momentos, gracias, por todo el tiempo que me invirtieron, y ojalá no los defraude.

A mis hermanos Mario y Gaby, que los quiero mucho, y que vean que si se puede, que si desean algo, pueden llegar a ello, espero que esto les sirva como un ejemplo a seguir. Gaby que a pesar de ser tan parecida a ti somos totalmente diferentes, pero sé que de mí tomas algo como ejemplo y que los consejos que te doy te llenen y los tomes en cuenta, Mario, espero que te sirva algo de aquí, yo creo en ti, y sé que me puedes superar.

Al Ing. Salvador Aldrett porque sin sus consejos y comentarios no hubiera tenido las ganas de superarme y salir al mundo, gracias por todo su apoyo.

A todos mis primos que también estuvieron al pendiente de mí Riki, Mireya, Eder, Daniel, Carla etc.

Luisa, que hubiera hecho yo sin ti, sin tus consejos, apoyo, regaños, paciencia y ante todo tú amistad, te convertiste en mi confidente, en la amiga que nunca tuve, graciassssss, no sé como agradecerte todo el tiempo invertido en mí, esto nunca se me olvidará, porque me convertiste en una persona con aspiraciones, competitiva, me hiciste creer en mí, cambié la forma de ver la vida. Eres y seguirás siendo la mejor maestra que hay y que he tenido. Gracias

A mis primeros alumnitos, Omar, Gaby y Joel, que son mis compañeros de camino, que nunca me abandonaron, que cuando más difícil se puso, aparecieron, y aparecieron por algo, me dio un gusto trabajar con ustedes porque a pesar de los momentos difíciles

salimos adelante con el proyecto. Omar gracias por escucharme, a pesar de lo cansados que estábamos, siempre estuviste ahí, por todo tu esfuerzo que pusiste, y vas a ver que va a valer la pena, te lo aseguro, espero que hayas obtenido de mi algún aprendizaje que te ayude en algo en tu carrera o en tu vida. Gracias. Gaby, gracias porque juntas empezamos, y las dos terminamos, sin tú apoyo no sería posible esto. Les deseo éxito a los tres.

A Diana Valtierra, porque en ella encontré una amiga que sin conocerme me aceptó como parte de su familia, Gracias, amiga, porque me has ayudado muchísimo, espero conservar tu amistad para siempre. En general a la familia Valtierra Rodríguez, por todo su apoyo que recibí, porque siempre estuvieron al pendiente de mí, no tengo como agradecerles. Ace y Sofía, porque me enseñaron muchas cosas, aunque las dos son totalmente diferentes, aprendí de cada una lo mejor, gracias por recibirme en su hogar y siempre brindarme su apoyo, gracias. Adriana Obregón, te incluyó aquí también porque también eres parte de la familia, porque somos muy parecidas y pasamos cosas juntas, gracias por tu apoyo y tú amistad.

Alejandrina Montes, gracias porque sé que cuento con una amiga en Tepic, Rosy, muchísimas gracias, aunque no conviví mucho tiempo contigo, siempre creíste en mí y tus consejos los tomé gracias. Ismael Malagón, gracias por ayudarme tanto en mi trabajo, por molestarte con tantas cosas, sabes que aquí cuentas con una amiga. Faby, Aldo, Nere y Alma graciasss por ser como son por sus consejos, por su compañía durante todo mi trabajo, siempre se los agradeceré. Nydia, gracias por escuchar, y ser como eres, porque eso te hace ser autentica, nunca cambies.

A todas estas personas les dedico este trabajo, porque sin todo el apoyo de ellas no hubiera, podido seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDOS

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
TABLA DE CONTENIDOS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE GRÁFICAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	18
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUCCIÓN.....	20
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVO GENERAL	25
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
7. ANTECEDENTES.....	27
7.1 Frutas y Hortalizas.....	28
7.2 Contaminación de frutas y hortalizas.....	30
7.2.1 Contaminación pre cosecha.....	30
7.2.1.1 Agua.....	30
7.2.1.2 Tierra y suelo.....	31
7.2.1.3 Heces	32
7.2.2 Contaminación post-cosecha.....	33
7.2.2.1 Contaminación cruzada.....	33
7.2.2.2 Lavado del producto.....	34

7.3	Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETAs).....	35
7.4	Microorganismos presentes en Frutas y Hortalizas.....	38
7.5	Microorganismos indicadores.....	41
7.5.1	Bacterias mesofílicas aerobias.....	41
7.5.2	Coliformes.....	42
7.5.3	Mohos y levaduras.....	43
7.6	Microorganismos Patógenos en Frutas y Hortalizas.....	45
7.6.1	<i>E. coli</i> O157:H7.....	45
7.6.2	<i>Salmonella</i>	47
7.6.3	<i>Campylobacter</i>	51
7.6.4	<i>Clostridium perfringens</i>	54
7.6.5	<i>Shigella</i> spp	56
7.6.6	<i>Listeria</i>	59
7.7	Métodos de detección de microorganismos en Frutas y Hortalizas.....	61
7.7.1.	Sistema TEMPO®.....	62
7.7.2	Sistema mini VIDAS®.....	64
8.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	68
8.1	Muestreo.....	68
8.2	Análisis microbiológicos.....	68
8.2.1	Preparación de la muestra para cuenta total de bacterias mesofílicas	68
8.2.2	Determinación de Cuenta Total de Mesofilicos Aerobios (CTV) y	69
8.2.3	Determinación de mohos y levaduras.....	69
8.2.4	Detección de <i>Salmonella</i>	69
8.2.5	Cuantificación de <i>Salmonella</i> spp.....	70
8.2.6	Detección de <i>L. monocytogenes</i>	71
8.2.7	Determinación de <i>Shigella</i> spp.....	71
8.2.8	Cuantificación de <i>Clostridium perfringens</i>	72
8.2.9	Determinación de <i>Campylobacter</i>	72
8.2.10	Determinación de <i>E. coli</i> O157:H7.....	73
8.3	Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	74
8.3.1	Extracción de DNA	74

8.3.2	Amplificación	75
8.3.3	Visualización.....	75
8.4	Técnica de PCR para <i>Clostridium perfringens</i>	76
8.4.1	Extracción de DNA.....	76
8.4.2	Amplificación	76
8.4.3	Visualización	77
8.5	Análisis Estadístico.....	77
8.6	Diagrama de Flujo de los métodos utilizados.....	78
9.	RESULTADOS.....	88
9.1	Cuenta Total de Microorganismos Mesofílicos Aerobios (CTV).....	88
9.2	Coliformes Total (CT)	90
9.3	Mohos	93
9.4	Levaduras	95
9.5	Microorganismos patógenos.....	98
9.5.1	<i>Salmonella</i> spp.	98
9.5.2	<i>Shigella</i> spp.	100
9.5.3	<i>Campylobacter</i> spp.....	100
9.5.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	101
9.5.5	<i>Clostridium perfringens</i>	103
9.5.6	<i>E. coli</i> O157:H7.....	104
10.	DISCUSIÓN.....	107
11	CONCLUSIONES.....	128
12.	LITERATURA CITADA	129
13.	RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	166

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Oligonucleótidos usados y especie que identifican.....	75
2. Oligonucleótidos usados y especie que identifican.....	76
3. Identificación de las especies de <i>Listeria</i> positivas por el sistema miniVIDAS.....	101
4. Cuentas de <i>C. perfringens</i> en muestras positivas de perejil	103
5. Resultados de muestras positivas para <i>E. coli</i> O157:H7	105
6. Muestras positivas de patógenos analizados en cada fruta y hortaliza analizada.....	105
7. Prevalencia de patógenos encontrados por cada municipio muestreado	106

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Número de muestras agrupadas en rangos dependiendo de las cuentas de microorganismos mesofílicos aerobios (CTV) obtenidas de supermercados y mercados populares establecidos mediante el sistema automatizado TEMPO® bioMérieux para cada fruta y hortaliza analizado.....	89
2. Distribución de la carga de microorganismos mesofílicos aerobios de frutas y hortalizas analizados por ANOVA. Puntos dentro de las cajas, representan el 50% de las muestras. Línea azul media del parámetro.....	89
3. Distribución de la carga de microorganismos mesofílicos aerobios analizados por ANOVA de frutas y vegetales procedentes de supermercado o mercados populares.....	90
4. Número de muestras agrupadas en rangos dependiendo de las cuentas de coliformes totales (CT) obtenidas de supermercados y mercados populares establecidos mediante el sistema automatizado TEMPO® BioMérieux para cada fruta y hortaliza analizado.....	91
5. Distribución de la carga de coliformes totales (CT) de frutas y hortalizas analizados por ANOVA. Puntos dentro de las cajas, representan el 50% de las muestras. Línea azul media del parámetro $p=0.05$	92
6. Distribución de la carga de coliformes totales (CT) analizados por ANOVA de frutas y vegetales procedentes de supermercado o mercados populares.....	92
7. Número de muestras agrupadas en rangos dependiendo de las cuentas de mohos (M) obtenidas de supermercados y mercados populares, obtenidos de acuerdo a la NOM-114-SSA 1-1994 para cada fruta y hortaliza analizada.....	94
8. Distribución de la carga de mohos (M) de frutas y hortalizas analizados por ANOVA. Puntos dentro de las cajas, representan el 50% de las muestras. Línea azul media del parámetro.....	94

9. Distribución de la carga de mohos (M) analizados por ANOVA de frutas y vegetales procedentes de supermercado o mercados populares.....	95
10. Número de muestras agrupadas en rangos dependiendo de las cuentas de levaduras (L), obtenidos de acuerdo a la NOM-114-SSA1-1994 para cada fruta y hortaliza analizada.....	96
11. Distribución de la carga de levaduras (L) de frutas y hortalizas analizadas por ANOVA. Puntos dentro de las cajas, representan el 50% de las muestras. Línea azul media del parámetro.....	97
12. Distribución de la carga de mohos (M) analizados por ANOVA de frutas y vegetales procedentes de supermercado o mercados populares.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquematización de la prueba del sistema automatizado TEMPO®.....	64
2. Esquematización de cartucho del sistema miniVIDAS®.....	65
3. Esquematización de cono del sistema miniVIDAS®.....	66
4. Comparación y resultado de la muestra positiva para <i>Salmonella</i> spp. según el sistema miniVIDAS® bioMérieux.....	99
5. Productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen <i>invA</i> (275pb) para <i>Salmonella</i>	99
6. Crecimiento y color de la colonia característico según el agar después de 24h a 37°C.....	100
7. Comparación y resultado de la muestra positiva para <i>Campylobacter</i> spp. según el sistema miniVIDAS®	101
8. Comparación y resultado de las muestras positivas para <i>Listeria</i> spp. según el sistema miniVIDAS®.....	102
9. Productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen de la hemolisina (234pb).....	102
10. Productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen <i>cpa</i> (324 pb) y <i>cpe</i> (233pb).....	104

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

-	Menos
\$	Pesos
%	Porcentaje
/	Por
+	Más
<	Menor que
>	Mayor que
±	Más menos
®	Marca registrada
°C	Grados Celsius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFAQ	Asociación Francesa para el Aseguramiento de la Calidad
AFNOR	Asociación Francesa de Normatización
α	Alfa
ANOVA	Análisis de Varianza
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Agrícolas
ATCC	American Type Culture Collection (siglas en inglés)
BAM	Manual Analítico Bacteriológico
β	Beta
CAMP	Cristie-Atkins-Munch-Peterson
cap.	Capítulo
CO ₂	Dióxido de Carbono
dATP	Desoxyadenosin trifosfato
dCTP	Desoxycitosin trifosfato
dGTP	Desoxyguanosin trifosfato
DNTP`s	Desoxyribonucleotidos trifosfato

dTTP	Desoxytimidin trifosfato
E.U.A.	Estados Unidos de Norteamérica
FAO	Organización de la Agricultura y Alimentación
FDA	Food and Drug Administration
FeSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato Ferroso Heptahidratado
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido Clorhídrico
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISO	Organización Internacional para Estandarización
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
KCl	Cloruro de Potasio
kg	Kilogramo (s)
l	Litro (s)
lb.	Libras
log	Logaritmo
log UFC/cm ²	Logaritmo de unidades formadoras de colonia por centímetro cuadrado
log UFC/g	Logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo
log UFC/ml	Logaritmo de unidades formadoras de colonia por mililitro
M	Molar
µg	Microgramo (s)
µl	Microlitro (s)
µm	Micromolar
µmol/l	Micromolar por litro
mg/l	Miligramo por litro

mg/ml	Miligramo por mililitro
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto (s)
MIO	Agar Movilidad Indol Ornitina
ml	Mililitro (s)
mM	milimolar
mmol/l	milimolar por litro
N	Nitrógeno
N.L.	Nuevo León
NMP	Número Más Probable
NMP/g	Número Más Probable por gramo
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p</i>	Probabilidad
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguadores de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
s	Segundo (s)
<i>t</i>	T de Student
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de colonia
UFC/g	Unidades formadoras de colonia por gramo
URS	Antigua Unión Soviética
UV	Ultravioleta
V	Voltio (s)

RESUMEN

Las frutas y hortalizas son alimentos básicos e importantes para la salud humana. México constituye un exportador importante de este tipo de productos, en muchas partes del mundo. Aunque en forma general la calidad de los productos de México se considera buena, brotes recientes hacen imperiosa la necesidad de monitorear su calidad.

En este estudio se evaluó la calidad microbiológica de frutas y vegetales históricamente vinculados a brotes importantes (melón, perejil, cebolla cambray, tomate, chile serrano y jalapeño) expendidos en Monterrey, N.L. y algunos municipios de su área Metropolitana, utilizando tecnologías nuevas y sensitivas.

Se analizaron un total de 300 muestras, colectadas en supermercados y mercados populares. El análisis de microorganismos coliformes totales y de mesofílicos aerobios se realizó con el sistema automatizado TEMPO®. Para la detección de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *C. jejuni/coli*, se empleó el sistema de inmunofluorescencia miniVidas®. La cuantificación de mohos y levaduras se llevó a cabo según lo especifica a normativa mexicana y la presencia de *C. perfringens* y *Shigella* spp se analizó según la metodología descrita en el BAM (FDA, EUA). En este estudio encontramos que las muestras presentaron niveles moderados de contaminación, que dependió del tipo de muestra analizada. Se encontraron 6 muestras con *C. perfringens*, una con *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp. y *L. monocytogenes* procedentes de perejil. Sin embargo, en todos los casos los patógenos estuvieron en muestras diferentes. No se detectó *E. coli* O157:H7 ni *Shigella* spp. en ninguna de las muestras. Por lo anterior se concluye que las cuentas de microorganismos indicadores fueron moderadamente elevadas comparadas con lo que marca las normas oficiales mexicanas para este tipo de productos (1.5×10^5 UFC/g para el caso de mesófilos aerobios y 100 NMP/g de coliformes), sin embargo, aunque la presencia de microorganismos patógenos fue baja, puede representar un riesgo para la población si no se realiza un tratamiento de desinfección adecuado antes de su consumo.

ABSTRACT

Fruits and vegetables are important foods for human health. Mexico is a major exporter of such products to many parts of the world. Although in general the quality of produce of Mexico are considered good, recent international outbreaks urge to monitor the microbiological quality of these products.

This study evaluated the microbiological quality of fruit and vegetable historically associated with major international outbreaks (melon, parsley, green onion, tomato, chili serrano and jalapeño) expended in the metropolitan area of Monterrey, N.L, using new and sensitive technologies.

We analyzed a total of 300 samples collected in supermarkets and popular markets. The analysis of total coliforms and total aerobic bacteria was performed with the automated system TEMPO ®. For the detection of *Salmonella* spp., *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* and *C. jejuni / coli* the miniVIDAS® immunofluorescence system was used. Quantification of yeasts and molds was carried out as specified in Mexican law and the presence of *C. perfringens* and *Shigella* spp were analyzed using the methodology described in the BAM (FDA, USA). In this study, the samples showed moderate levels of contamination, which depended on the type of sample analyzed. Six samples were found with *C. perfringens*, one with *Salmonella* spp, one with *Campylobacter* spp. and other one with *L. monocytogenes* (parsley), the pathogens were isolates from separated samples. No *E. coli* O157: H7 and *Shigella* spp. was detected in the samples. The numbers of indicator microorganisms were high compared with the parameters of Mexican Official Standards for this type of product (1.5×10^5 CFU / g in the case of mesophilic aerobes, and 100 MPN / g of coliforms), although the presence of pathogens was low, it may represent a risk to the population if appropriate measures are avoided prior to consumption.

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) constituyen, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), uno de los problemas de salud más extendidos en el mundo contemporáneo y una causa importante de reducción de la productividad económica.

Se conocen alrededor de 250 de estas enfermedades, sin embargo, no es fácil comparar los datos entre los países ya que los mismos dependen directamente de la eficiencia de sus sistemas de vigilancia (Pesca, 2007).

Por otro lado, la tendencia en los consumidores se ha desviado a la búsqueda de productos más naturales, con el procesamiento mínimo que permita mantener sus propiedades nutritivas y sensoriales originales. En los últimos años se ha incrementado el consumo de frutas y vegetales ya que son parte esencial de las dietas de las personas en todo el mundo (Beuchat, 1996). Hasta hace algunos años estos alimentos eran considerados relativamente seguros en comparación con los alimentos de origen animal. Recientemente se ha enfocado la atención a estos como potenciales vectores de enfermedades (Arthur, 2007), aun cuando tienen poco procesamiento, por el mismo pierden sus barreras protectoras y son más susceptibles a contaminación y deterioro (OMS, 2002).

La globalización ha contribuido a que las frutas y vegetales estén disponibles en cualquier lugar y estación del año (Sivapalsingam, 2004), a su vez, cambios en el procesamiento y prácticas en el manejo han resultado en la expansión y distribución geográfica de las enfermedades asociadas con el incremento del número de bacterias, virus y parásitos (Sagoo, 2003).

Las frutas y vegetales pueden ser contaminados con microorganismos patógenos en cualquier punto durante su crecimiento, almacenaje, procesamiento, distribución y preparación final (Sivapalasingam, 2004).

En recientes años, se ha incrementado el número de brotes por enfermedades gastrointestinales ligado al consumo de frutas y vegetales. Entre 1990 y 2001, se reportaron un total de 148 brotes asociados a productos frescos contaminados, en donde aproximadamente el 9% se ligó a frutas y vegetales (Mukherjee, 2004), de estos solo 8 han sido asociados a productos de origen mexicano exportados hacia Estados Unidos.

Por lo tanto, las frutas y hortalizas pueden presentar algún nivel de riesgo, para poder causar enfermedades transmitidas por los alimentos, si no se maneja apropiadamente antes de su consumo. Se debe reconocer la necesidad de vigilancia para controlar los riesgos microbiológicos, a fin de reducir estas enfermedades (Pesca, 2007).

En base a lo anterior, en este estudio se evaluó la calidad microbiológica de 300 muestras de frutas y hortalizas recolectadas de mercados populares y supermercados en Monterrey y algunos municipios de su área Metropolitana utilizando tecnologías automatizadas.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La inocuidad alimentaria es un tema que día a día cobra mayor vigencia, tanto en el ámbito nacional como en el internacional. La disponibilidad de alimentos de buena calidad sanitaria es un reclamo universal, y su demanda es mayor conforme la población adquiere conciencia de la importancia que tiene para su salud el consumo de alimentos contaminados con cualquier tipo de patógenos. El aumento de la población mundial, la concentración urbana y el incremento en la demanda de alimentos traen como consecuencia el incremento de enfermedades. En el mundo actual, la cadena de producción y distribución de alimentos es cada vez más larga y en la mayoría de los casos el alimento llega hasta el consumidor luego de haber recorrido una serie de modificaciones y transformaciones (Avendaño *et al.*, 2002).

Las recomendaciones dietéticas formuladas hacen que la población busque alimentos con mayor contenido nutricional y de fácil adquisición. Aunado a lo anterior, se ha incrementado el consumo de frutas y vegetales, lo cual ha traído como consecuencia marcados cambios en el estilo de vida con respecto a los hábitos, usos y gustos alimentarios de grandes segmentos de la población. El consumo de frutas y vegetales durante 1998 en Estados Unidos fue de cerca de 64 millones de toneladas de las cuales 55% eran vegetales y 45% frutas. El dato per cápita incrementó de 282 a 445 libras durante el 2002 y 2004 y 690 libras en 2005 (Anuario Estadístico de la Secretaría de Salud, 2002).

La comercialización de alimentos de calidad e inocuos se está convirtiendo poco a poco en la clave del éxito en el comercio internacional, y son los gobiernos de los países importadores los que están recurriendo a la aplicación de regulaciones y normas estrictas, que garanticen que los productos que se introducen a sus países cumplan con los más altos estándares de producción, de igual o más altos que los producidos domésticamente, y evitar así poner en riesgo la salud de sus consumidores (Avendaño *et al.*, 2002).

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son la causa más importante en la reducción del crecimiento económico. El costo anual de estas enfermedades alimentarias en los Estados Unidos se estima de 10 a 83 billones de dólares (FDA, 2002). Se estima que la industria que comercializa fresa en 1996 perdió 50 millones de dólares debido a brotes que se han presentado por el consumo de este producto (Bihn *et al.*, 2000).

Además se sabe que el comercio exterior de México se realiza fundamentalmente con Estados Unidos; es así que una amplia variedad de productos están disponibles a lo largo del año en este país de entre los que se encuentran la frutas y verduras como principales productos (Torres and Trapaga, 2003). A su vez, estos productos han sido asociados como causa de brotes en ese país, viéndose a las frutas y hortalizas de origen mexicano, como un riesgo hacia el consumidor.

Es por ello que se deben aplicar las medidas concernientes a la vigilancia y control de la inocuidad alimentaria de estos productos a nivel nacional e internacional cubriéndose las etapas relacionadas a los procesos agrícolas de manufactura, almacenaje, distribución y exportación del producto, ya que cada una de estas etapas puede convertirse en un punto de riesgo de contaminación para el alimento (Altekruse *et al.*, 1997).

Sin embargo, las investigaciones realizadas en nuestro país en este campo son pocas, y existen muy pocos datos epidemiológicos en este rubro. Es por ello, que se necesitan datos epidemiológicos, acerca de la calidad microbiológica de las frutas y hortalizas que son producidas en nuestro país al igual de las que son exportadas.

HIPÓTESIS

El melón, cebolla cambray, perejil, tomate, chile serrano y jalapeño que se expenden en el Monterrey, Nuevo León y algunos municipios de su área Metropolitana presentan cuentas moderadas de microorganismos indicadores, y no están contaminados con microorganismos patógenos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad microbiológica y determinar la presencia de patógenos específicos en melón, cebolla cambray, perejil, tomate, chile serrano y jalapeño expendidos en Monterrey, N.L. y algunos municipios de su área Metropolitana.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la presencia y el número de microorganismos indicadores (mesófilos aerobios, coliformes totales, mohos y levaduras) en melón, cebolla cambray, perejil, tomate, chile serrano y jalapeño que se expenden en Monterrey y algunos municipios de su área metropolitana.
2. Identificar la presencia de los microorganismos *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. y *Clostridium perfringens*
3. Confirmar la presencia de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. y *Clostridium perfringens* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

ANTECEDENTES

7.1 Frutas y Hortalizas

Las frutas y las hortalizas frescas han formado parte de la dieta humana desde el comienzo de la historia, y su consumo ha ido en aumento debido a que representan una extraordinaria fuente de nutrientes, micronutrientes, vitaminas y fibra para el hombre (Brackett, 1997).

Se denominan frutas y hortalizas aquellas partes comestibles de las plantas (Brackett, 1997), entre las que incluyen las hojas, tallos, raíces, tubérculos, bulbos, flores y semillas (Frazier and Wethoff, 1993). Una hortaliza se considera como al conjunto de plantas cultivadas generalmente en huertas o regadíos, que se consumen como alimento, estas incluyen a las verduras y legumbres, en tanto que un fruto es un ovario maduro; carnoso y comestible de una planta leñosa o perenne que, en su desarrollo, está estrechamente asociado con la flor (Wills B. *et al.*, 1998; Denisen, 1991).

Durante las tres últimas décadas, el consumo de frutas y hortalizas frescas en el mundo se ha incrementado (Sumathi S, *et al*, 2004); debido principalmente ya sea a los beneficios de una dieta sana, la fácil adquisición del producto (Beuchat, 1996), el alto impacto de campañas publicitarias realizadas a nivel mundial (Heaton, *et al.*, 2008) o bien, por el incremento de la población.

Además, gracias a la asociación que ha existido entre la ingesta de grasas saturadas en ciertas dietas de personas con enfermedades cardiovasculares, se ha generado un cambio en el estilo de vida de la población, tendiendo a consumir más productos vegetales (Cuellar, 2002).

La producción mundial de las frutas y hortalizas creció un 30% entre 1980 y 1990 y un 56% entre 1990 y 2003, alcanzando 1,274 millones de toneladas en el 2003 (Diop and Jaffe, 2002). En la Unión Europea dicha producción es cercana a los 76 millones de toneladas al año, donde dos tercios lo constituyen las hortalizas y un tercio las frutas (European Comisión, 2002).

Aunado a lo anterior, el consumo per cápita de frutas y hortalizas en Estados Unidos incrementó de 254 a 328 lbs de 1980 al 2000 (Cuellar, 2002). Así mismo, en Canadá de 1999 a 2003 el consumo anual de estos productos se incrementó un 8% alcanzando un consumo de alrededor de 117.5 kg por persona (Bohaychuk, *et al*, 2009). En México el incremento ha sido lento, sin embargo no deja de ser importante, aun cuando solo se consume aproximadamente 56 kilos de hortalizas por habitante al año, en comparación con otros países (Cuellar, 2002).

Se ha reportado que la industria de hortalizas contribuye significativamente a la economía mundial, tal es el caso de Alberta en Canadá, en donde se generan entre \$160-165 millones de dólares canadienses de ingresos anuales (Bohaychuk, *et al.*, 2009) en este rubro. En Estados Unidos, se observó un incremento de las ganancias en establecimientos de punto de venta y servicios de alimentos, este incremento fue de \$36 billones de dólares entre 1987 y 1997. En el 2006, los productores mexicanos de frutas y hortalizas registraron ingresos por once mil 218 millones de dólares (Arredondo E, 2009).

Los países que principalmente producen frutas y hortalizas son en primer lugar China e India (27%), luego Estados Unidos (10%), la Comunidad Europea (13%) y la antigua URSS (15%), todos ellos aportando entre el 65% de la producción mundial. En 1992, México participó con el 1% de la producción mundial de frutas y hortalizas, es decir sembró aproximadamente 500,000 hectáreas (Siller, s.f.). En datos más recientes según el Departamento Económico Social de la Organización de la Agricultura y Alimentación (FAO) se ubicó a México en el 12° lugar en producción de frutas y hortalizas en el 2005,

donde poco a poco se ha observado un incremento (Departamento Económico Social de la Organización de la Agricultura y Alimentación (FAO, 2005).

México actualmente se considera un país importante en la exportación de frutas y hortalizas para Canadá, Estados Unidos y consumo domestico, el comercio representó el 49 % de las importaciones y el 53% de las exportaciones del Tratado de Libre Comercio de Norte América en el 2001 (Scott and Malanoski, 1997; Diop and Jaffe, 2002). Nuestro país en 1992 ocupó el sexto lugar en exportación, proporcionando a los mercados internacionales 1.60 millones de toneladas (Siller, s.f.).

De las entidades federativas de nuestro país, el 57 % de producción de las 49 especies hortícolas que se exportan se concentra en los estados de Sinaloa, Guanajuato, Sonora, Querétaro, Estado de México, Baja California, Jalisco y Morelos. En tanto que el sector productivo de frutas, concentra el 87% de las 76 especies frutícolas que se producen a nivel comercial en los estados de Michoacán (24.6%), Colima (11.3%), Nayarit (10.8%), Tamaulipas (10.5%), Tabasco (8.9%), Chiapas (8.9%), Sonora (7.2%), Jalisco (2.4%) y Veracruz (2.0%) (Siller, s.f.).

Estados Unidos es el principal destino para las exportaciones de frutas y hortalizas de México (Comunidad Andina, 2004); ocupando el 55% del volumen total de las exportaciones en el 2000. Además, mantiene una balanza comercial con ese país, la cual en los últimos cinco años ha crecido en un 40%, al pasar de 6,368 millones de dólares 8,913 en 1993.

Entre los principales productos exportados por México hacia el extranjero se encuentran, en el caso de frutas, limón (27.7%), mango (23.2%), plátano (18.3%), y uva de mesa (14.8%). Las principales hortalizas, las cuales componen el 75% de la oferta exportable son seis: tomate, pepino, melón, sandía, chile y calabaza con el 30.2, 11.2, 9.7, 9.7, 5.8 y 8.4 % respectivamente. El 70% del valor generado de divisas en la

temporada 1997-98 fue obtenido por los productos: tomate (29.5%), pepino (9%), melón (7.9%), cebolla (7.9%), calabaza (7.8%), y uva de mesa (7.1%) (Siller, s.f.).

7.2 Contaminación de frutas y hortalizas

7.2.1 Contaminación pre-cosecha

Las frutas y hortalizas pueden ser contaminadas con microorganismos patógenos mientras crecen en el campo de cultivo, durante su recolecta, el manejo, procesamiento y su distribución (Beuchat, 1996; Lee, 2004; Ailes, *et al.*, 2008). En la precosecha, las fuentes de contaminación son la tierra, el agua de riego, la presencia de material fecal o animal, el tipo de abono utilizado, el aire y el personal que se encarga del manejo del producto (Fernández, 2008). Analizaremos individualmente cada uno:

7.2.1.1 Agua

Durante la producción de frutas y hortalizas, se utiliza el agua para numerosas actividades en el campo, incluido el riego y la aplicación de pesticidas y fertilizantes (FDA, 1998). Guan *et al.* y Ng *et al.* (2005) encontraron que algunos pesticidas, cuando son diluidos con agua contaminada, pueden promover el crecimiento de patógenos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella* y *Listeria* (Guan, *et al.*, 2001; Ng, *et al.*, 2005). De la misma manera Izumi (2008) *et al.* reportaron cuentas de 10^6 UFC/ml en soluciones de insecticidas (Orthene o Albarin gránulos solubles en agua) que se resuspenden con agua, indicando que estos pesticidas no matan a los microorganismos tales como *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 (Izumi, *et al.*, 2008)

Existen evidencias donde se demuestra que el uso de agua de riego contaminada puede incrementar la frecuencia de microorganismos patógeno en productos frescos (Díaz and Vernon, 1999). En estudios recientes se encontró la presencia de *Salmonella* spp. en agua de irrigación, aguas superficiales y agua de drenaje (Duffy, *et al.*, 2007). Algunos

autores reportaron que el agua de irrigación es un buen indicador para el monitoreo de patógenos durante la producción de germinados como los de alfalfa (Solomon, *et al.*, 2002, 2003; Steele, *et al.*, 2005).

En países como Bélgica y Finlandia se encontró en el 20% de las muestras analizadas de aguas residuales la presencia de *Listeria monocytogenes* (European Commission, 2002).

7.2.1.2 Tierra o suelo y animales

La tierra es otro importante reservorio generoso de microorganismos, entre los cuales no se descartan los patógenos (Fernández, 2008). Entre ellos, son comúnmente encontrados en el suelo esporas de especies de *Clostridium*, como *C. botulinum* y *C. perfringens*, al igual que esporas de *Bacillus cereus* enterotoxigénico (Beuchat and Ryu, 1997). De hecho esporas de *C. perfringens* son consideradas como un indicador de contaminación fecal en alimentos (Hirotani, *et al.*, 2001).

La contaminación de los vegetales con microorganismos presentes en el suelo se puede dar cuando hay lluvia intensa o a través del agua de riego, por medio de la salpicadura de esta agua, ya que se sabe que muchos vegetales crecen en el suelo o tienen mucho contacto con este (Heaton and Jones, 2007).

Por otra parte, los animales contribuyen a ser un vehículo de contaminación, y además pueden acelerar la degradación de los productos agrícolas reduciendo en gran medida la calidad y el período de vigencia de los productos frescos (Bihn, *et al.*, 2002).

Como fuente de contaminación animal a las frutas y hortalizas se incluyen las heces de animales domésticos, de crianza, silvestre e insectos (Fernández, 2008). Algunas especies de pájaros pueden diseminar ciertas especies de *Campylobacter* spp.,

Salmonella spp., *Vibrio cholerae* y *Listeria*. Más recientemente *E. coli* O157:H7 fue aislada de las heces de pájaros (Beuchat and Ryu, 1997).

7.2.1.3 Heces

Las frutas y hortalizas que crecen en el suelo o tienen contacto directo con éste, pueden contaminarse por heces humanas o de animales, propiciando la contaminación con patógenos y su fijación en la cáscara, lo que posteriormente puede llevar a la contaminación de la pulpa al tiempo de ser extraída (Fernández, 2008).

Por otra parte, se sabe que el estiércol, lodos activos y compostas de origen humano y animal son comúnmente utilizados como fertilizantes orgánicos para la producción de frutas y hortalizas, incrementando la posibilidad de la contaminación de estas, con microorganismos patógenos (European Commission, 2002).

En algunas partes del mundo aun se emplea como abono el contenido de las letrinas, aunque esta práctica es rara en los Estados Unidos (Frazier and Westhoff, 1993), en otros países como Reino Unido más de 90 millones de toneladas de desechos de animales son colocados en los campos de cultivo anualmente (Food Standards Agency 2004, Aviation House, London, UK). Islam *et al.* (2004) reportaron que *E. coli* O157:H7 puede estar presente por más de 5 meses en el suelo, después de la aplicación de fertilizantes orgánicos y agua de irrigación contaminada (Islam, *et al.*, 2004).

Patógenos fecales como *E. coli* O157:H7; que sobrevive en heces bovinas y en el suelo por más de 70 días puede adherirse a la superficie de los productos y causar contaminación al momento de cortar el producto (Sivapalasingam, S., *et al.*, 2004). Además se ha reportado que cuando *E. coli* O157:H7 está presente en el suelo, tiene la capacidad de internalizarse a los tejidos de las raíces de las plantas y,

subsecuentemente, ser transportados por el sistema vascular hacia las partes aéreas de estas hasta llegar a las hojas y frutos. Esto podría limitar la eficacia de los lavados que se les da a estos productos después de la cosecha (Hora, *et al.*, 2005).

También, se ha determinado que el uso previo que se le haya dado al suelo, influye en la cantidad de patógenos presentes y en el riesgo que pueden tener los productos de ser contaminados. Así, si el terreno se utilizó para alimentar o producir animales puede incrementar en gran medida el riesgo de contaminación de los productos que ahí se cultiven (Bihn, *et al.*, 2002).

7.2.2 Contaminación post-cosecha

Al igual que los riesgos que se tienen durante la precosecha y cosecha, no se pueden omitir los riesgos durante su procesamiento. Las fuentes de contaminación pos-cosecha incluyen heces de animales, insectos, otras frutas, vehículos o contenedores en donde se transporta el producto, agua de lavado, equipo de corte, embalaje y clasificación así como manipuladores que tienen contacto con el producto (Izumi, *et al.*, 2008).

Estudios previos demostraron que las cuentas de bacterias mesofílicas aerobias y mohos, en la superficie de las frutas se incrementó de 2.5×10^2 UFC/g para mesófilos y 1×10^3 UFC/g para los segundos a 3.2×10^3 y 8.0×10^3 UFC/g respectivamente durante el manejo pos-cosecha (Izumi, *et al.*, 2008).

Algunos factores que contribuyen a la contaminación post-cosecha, se incluye:

7.2.2.1 Contaminación cruzada

Existen riesgos de contaminación cruzada durante la producción de las frutas y hortalizas, ya que cualquier materia que esté en contacto con estos productos se puede volver una fuente importante de contaminación microbiana.

La contaminación cruzada y la manipulación por el personal, fueron los dos factores más comúnmente reportados, que contribuyeron a la existencia de brotes por ensaladas en Inglaterra y Gales en el periodo de 1992-2000, destacando la importancia del entrenamiento del personal y las buenas prácticas de higiene (Sagoo, *et al.*, 2001, Long, *et al.*, 2002).

Los empleados que padezcan una infección (tengan síntomas o no) pueden contaminar fácilmente los productos frescos con patógenos microbianos si no se practica una buena higiene, tal como el lavado de manos después de un estornudo, al tocarse el pelo u otras partes del cuerpo, o después de ir al baño. Estos patógenos pueden luego ser transmitidos a personas que manipulan o comen el producto hortofrutícola contaminado (Bihn, *et al.*, 2002; Kaneko, *et al.*, 1999).

7.2.2.2 Lavado del producto

De la misma manera, grandes cantidades de hielo se usan para mantener la calidad de algunos productos frescos en diferentes etapas de la cadena de producción. El hielo puede tener contacto con productos contaminados y transferir los patógenos de superficies contaminadas a no contaminadas a través del movimiento del agua derretida. En este ámbito, en un estudio realizado por Kim y Harrison (2008) evaluaron el grado de contaminación por *E. coli* O157:H7 al estar en contacto con hielo y el agua derretida, en lechuga romana, demostrando que este microorganismo puede ser transferido a otras capas del producto dentro de contenedores utilizados para su transporte por la diseminación del agua contaminada del hielo derretido y así contaminar las superficies de las hojas.

Como consecuencia a lo anterior, el lavado del producto es un importante proceso comúnmente empleado por la industria alimentaria para remover restos de suelo y desechos, reduciendo así las poblaciones microbianas (Wang *et al.*, 2007). El

tratamiento de lavado que se realiza post-cosecha, se aplica utilizando hipoclorito de sodio (100 -200 ppm), que remueve la contaminación adquirida durante el campo, sin embargo se tiene bien establecido que este procedimiento solo logra la reducción de menos de 2 log de bacterias (Warriner *et al.*, 2003).

Como ejemplo de fallas en el lavado de frutas y hortalizas se ha reportado la contaminación de tomates con *Salmonella* Javania y de perejil con *Shigella sonnei*, que fueron responsables de grandes brotes en Estados Unidos (European Commission, 2002). Akins *et al.*, reportaron que los melones tuvieron un incremento significativo de microorganismos indicadores ($<0.5 \log \text{ UFC/cm}^2$) después de ser lavados, sugiriendo que puede haber riesgo de contaminación después de este tratamiento (Akins *et al.*, 2008).

Además se tienen reportes donde bacterias como *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* se adhieren a superficies dañadas de hojas de lechuga y penetran tejidos internos, logrando la protección por algunos sanitizantes como el cloro. Se ha demostrado que manzanas al ser inmersas en agua de lavado pueden contribuir a ser un factor de riesgo para la reproducción de patógenos (Buchanan, *et al.*, 1999). Debido a esto el tratamiento que se les da a estos productos es ineficiente, logrando incluso la reproducción de los patógenos (Heaton, 2007).

Hasta hace algunos años, las frutas y hortalizas fueron considerados relativamente seguros para su consumo (Arthur, 2007). Aunque los alimentos de origen animal (como los productos cárnicos o lácteos) son con mayor frecuencia los que más se involucran en brotes de ETAs, se han reportado brotes a partir de hortalizas (Parrilla *et al.*, 1993).

7.3 Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETAs)

Las ETAs son un problema de Salud Pública a nivel mundial (Little and Gillespie, 2004), debido al surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos

poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y al impacto socioeconómico que ocasionan (Zucca *et al.*, 1998).

Las ETAs se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva (Faber and Peterkin, 1991). Siendo el resultado de la falta de higiene en los alimentos, o del manejo inadecuado de los mismos, como la temperatura de enfriamiento inadecuada durante su conservación, contaminación cruzada, cocción inadecuada y/o utilización de equipo contaminado para su preparación (González and Rojas, 2005).

Los síntomas de estas enfermedades dependen del tipo de contaminación, agente patógeno presente y susceptibilidad del huésped principalmente. Los síntomas de ETAs generalmente incluyen diarreas y vómitos, aunque también se pueden presentar dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble, ojos hinchados, dificultades renales, etc., e inclusive, pueden generar enfermedades crónicas y secuelas muy graves (OMS, 1989; Parrilla *et al.*, 1993).

En países industrializados el porcentaje de personas que han sufrido alguna ETA se estima que se encuentra por encima del 30% según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002). Por ejemplo, tan solo en Estados Unidos, 76 millones de casos de ETAs provocaron 325,000 hospitalizaciones y 5000 muertes cada año. Se estima que esto genera pérdidas económicas de 6.9 billones de dólares, además de disminución en la productividad, altos costos médicos y promulgación de alertas sanitarias (Mead, et al., 1999; Techink, 2001).

Entre 1990 y 2001 se reportaron en E.U.A. 1589 brotes de ETAs (CSPI, 2001) donde los cinco principales alimentos involucrados fueron: pescados y mariscos, con 340 brotes (21% del total); huevos, con 271 brotes (17%); frutas y verduras frescas, con 148 brotes (9%); carne, con 134 brotes (8%) y aves, con 79 brotes (Altekruse *et al.*, 1997).

De los 148 brotes atribuidos a frutas y hortalizas frescas, solo cinco fueron relacionados directamente a importaciones provenientes de México (CDC, 2006).

Cada año, la OMS recibe informes sobre la ocurrencia de cientos de miles de casos de ETAs, en todo el mundo; de ellas, se ha determinado que entre las más frecuentes y numerosas son causadas por alimentos contaminados por agentes biológicos (SVETA, 2000), encontrándose a las bacterias y los virus como los agentes causales más importantes. Entre estos se puede mencionar a *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* enterohemorrágica (Jiménez and Martín, 2004; Castro *et al.*, 2006).

Para el caso de Latinoamérica y el Caribe, datos estadísticos revelan que casi la mitad de las enfermedades transmitidas por los alimentos que tuvieron un origen identificable fueron provocadas por fuentes microbianas (Bihn, *et al.*, 2002).

Para el 2006 el Centro de Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) de E.U.A. reportó 223 brotes causados por bacterias provenientes de alimentos con 5336 casos, de los cuales 337 fueron ocasionados por virus (CDC, 2006). Se ha estimado, que en México el número de casos por ETAs asciende a 200 millones por año (Castro *et al.*, 2006).

En nuestro país de 1980 a 1989 se notificaron a la Dirección General de Epidemiología, 314 brotes de ETAs, con un total de 12,344 casos y 348 defunciones. De éstos, 227 fueron de origen microbiano o parasitario (Parrilla *et al.*, 1993). Las bacterias *Escherichia coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena, *Salmonella enteritidis*, *Shigella* spp, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica*, ocasionan en conjunto, entre el 40 y 50% de las ETAs. Se estima que cada año ocurren alrededor de 3000 defunciones en niños y ancianos, casi todas prevenibles, sobre todo en los estados del sur del país (Kumate *et al.*, 2004).

Para el 2003, hasta la semana 53 se reportaron en nuestro país 154,687 casos nuevos de diarreas acumulados, donde el 32.4% de las diarreas fue causado por amibiasis intestinal y giardiasis y el resto, (67.6%) por virus y bacterias (Borbolla, 2004). En tanto que hasta la semana 45 del año 2007 en México, las enfermedades infecciosas intestinales ocuparon el segundo lugar, con 87,066 casos reportados, de los cuales 33 898 fueron causadas por intoxicación alimentaria bacteriana (Boletín Semanal de Epidemiología, 2007).

Datos más recientes (2008) reportados por la FoodNet mostraron que se produjeron 18,499 casos confirmados de ETAs donde la incidencia fue: *Salmonella* (16.20%), *Campylobacter* (12.68%), *Shigella* (6.59%), *Cryptosporidium* (2.25%), *Escherichia coli* O157 (1.12%), *Escherichia coli* no-O157 (0.45%), *Yersinia* (0.36%), *Listeria* (0.29%), *Vibrio* (0.29%) y *Cyclospora* (0.04%) (CDC, 2008).

7.4 Microorganismos presentes en Frutas y Hortalizas

La carga microbiana que se encuentra presente en las frutas y hortalizas como flora natural, está compuesta en su mayoría por bacterias ácido-lácticas y Gram negativas pertenecientes al grupo de las *Pseudomonas* o *Enterobacteriaceae*, así como hongos y levaduras (European Commission, 2002). De las especies encontradas del género *Enterobacteriaceae*, cerca de 80 a 90% son predominantemente especies de *Enterobacter* y *Erwina* (Manvell, and Acland, 1986; Brocklehurst, *et al.*, 1987; Nguyen, and Prunier, 1989; Garg *et al.*, 1990; Magnuson *et al.*, 1990; Marchetti *et al.*, 1992). Loui *et al.*, en el 2008 reportaron comunidades bacterianas de las familias *Enterobacteriaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Moraxellaceae* y *Sphingomonadaceae*, asociadas a las hojas alfalfa (Liao and Fett, 2001; Loui C. *et al.*, 2008).

Las bacterias lácticas, incluyen las especies de *Lactobacillus brevis* y *L. plantarum*, *Leuconostoc dextranicum* y *L. mesenteroides*, así como *Streptococcus faecium* y *S. faecalis*. También pueden existir especies de *Bacillus*, levaduras y mohos. Se ha

reportado la presencia de bacterias ácido lácticas en ensaladas mixtas y zanahoria rallada, sobre todo cuando se produjo un abuso de temperatura (30°C) (Francis, 1999).

Se ha establecido además que el número de bacterias presentes, dependerá del producto y del medio en que se encuentren, la estación del año, las variaciones del clima, etc.; pudiendo oscilar desde unos pocos cientos o miles por centímetro cuadrado de superficie, hasta millones (ICMSF, 1980). Se ha encontrado que en la superficie de un tomate perfectamente lavado, puede haber de 400 a 700 microorganismos por centímetro cuadrado, mientras que uno que no se hubiese lavado podría contener varios miles. Los tejidos externos de la col sin lavar podrían contener de 1 a 2 millones de microorganismos por gramo, aunque la col lavada y troceada podría contener de 200,000 a 500,000 (ICMSF, 1980).

En el caso de las frutas y hortalizas, los problemas de contaminación más comunes que se ocasionan, son los típicos producidos por los denominados gérmenes de superficie o gérmenes de barreras superficiales (Zucca *et al.*, 1998). Entre éstos, patógenos presentes en la superficie del producto, por ejemplo, la del melón que puede contaminar la parte interna al momento de cortarlo (Altekruse *et al.*, 1997).

Es muy importante la interacción entre los microorganismos patógenos y las superficies de las frutas y/o hortalizas, de manera que si el microorganismo persiste en la superficie, tiene la oportunidad de reproducirse y alcanzar la dosis infecciosa suficiente aumentando así el riesgo al consumir el producto (Heaton and Jones, 2007). En el caso particular del melón, el tipo de superficie rugosa que posee favorece la adhesión de microorganismos (Ukuku and Fett, 2004).

Otra manera de lograr la supervivencia microbiana es por medio de agregados celulares como los biopelículas. Estas constituyen entre 30 y 80% del total de las poblaciones en la superficie de las plantas, ya que al formar este tipo de asociaciones, hace más difícil la eliminación de estos microorganismos por los métodos de

saneamiento convencionales, aumentando la probabilidad de sobrevivencia del patógeno. Se ha reportado la formación de biopelículas de *Salmonella* spp. en melón (Annous, *et al.*, 2005).

Además para complicar el panorama, se tienen reportes de bacterias patógenas formando asociaciones con otros microorganismos, para poder establecer un sinergismo y permitir la utilización de nutrientes para ambas especies; un ejemplo, para el caso de *Salmonella* Enterica puede asociarse con *Pantoea agglomerans* en la superficie del cilantro (Brandl and Mandrell, 2002).

Otra forma de interacción planta – microorganismo, lo constituye el quórum sensing, donde se producen ciertas sustancias como Acyl-homoserin- lactonas (AHLs) que ayudan a regular factores de expresión que son capaces de incrementar la resistencia al estrés producido por las plantas tales como la desecación, entre otros (Brandl, 2006).

Además, la manipulación excesiva del producto puede representar un peligro a la salud y aumentar los riesgos de que se desarrolle una mayor contaminación microbiana. Al ser cortadas las frutas y hortalizas son más susceptibles al deterioro químico y microbiológico, como consecuencia, a la destrucción de las células durante este proceso. Los exudados producidos con ello, son ricos en minerales, azúcares, vitaminas, y otros compuestos liberados (Froder, *et al.*, 2007), que propician a los microorganismos a desarrollarse más rápidamente, debido a la mayor disponibilidad de nutrientes y agua (ICMSF, 1980). A lo largo de los pasados 13 años, se han reportado 14 brotes donde se involucra directamente al melón. Más de la mitad de estos brotes se asociaron a melones que fueron cortados, más no consumidos inmediatamente, permitiendo el crecimiento del microorganismo en el interior de la fruta debido a su alto contenido de azúcares (Akins, *et al.*, 2008).

7.5 Microorganismos indicadores

La producción de alimentos microbiológicamente seguros, precisa de técnicas analíticas capaces de detectar microorganismos patógenos. Sin embargo, está claro que los alimentos seguros sólo pueden ser producidos mediante el empleo de prácticas higiénicas adecuadas, incluyendo la prevención de la contaminación, pudiendo emplear para evaluar estos microorganismos indicadores, que proporcionan información indirecta acerca de la calidad sanitaria de los productos alimenticios (Smoot and Pierson, 1997).

Históricamente los indicadores de inocuidad, han supuesto que los patógenos de interés mayormente son constituidos por microorganismos de origen intestinal, que pueden llegar a los alimentos por mecanismos directos o indirectos. Microorganismos no patógenos, pero presentes en el intestino han sido usados como indicadores de contaminación fecal de aguas y con ello la posible presencia de patógenos intestinales. El primer indicador de contaminación fecal utilizado fue *Escherichia coli* (ICMSF, 1980; Zucca, *et al.*, 1998).

Actualmente se estima que los microorganismos indicadores de la calidad microbiológica o vida útil de los alimentos, son aquellos microorganismos (y/o sus productos metabólicos) cuya presencia en alimentos específicos en cantidades determinadas son usados para evaluar la calidad existente y mejor aun, para predecir la vida útil de los alimentos. Cuando se usan de este modo, los microorganismos indicadores deben cumplir los criterios siguientes: deben estar presentes y ser detectables en todos los alimentos cuya calidad se debe evaluar, su multiplicación y su número debe tener una relación directa negativa con la calidad del alimento, deben ser detectados y contados fácilmente. Además, deben poder diferenciarse claramente de otros microorganismos y contarse en un corto tiempo, a ser posible en una jornada de trabajo. Su conocimiento no debe ser obstaculizado por otros componentes de la flora de alimento (Zucca, *et al.*, 1998). Entre los microorganismos indicadores de inocuidad más

importantes en el área alimentaria se encuentran las bacterias coliformes totales y fecales, bacterias mesofílicas aerobias, *C. perfringens*, así como los mohos y levaduras.

7.5.1 Bacterias mesofílicas aerobias

Estos microorganismos son los más valiosos como indicadores del estado microbiológico existente en determinados alimentos y como predictores de la vida útil del alimento (James, 1992). Incluyen todas aquellas bacterias que pueden crecer a temperatura moderada (30 a 37°C), en un medio aerobio.

La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente y la misma refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado (NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.).

Cabe mencionar que en la cuenta de estos microorganismos, solo se miden células vivas y es de escaso valor si se pretende conocer la calidad organoléptica (Smoot and Pierson, 1997). El ensayo para la cuenta total de bacterias mesofílicas aerobias de alimentos perecederos refrigerados como leche, carnes, carne de pollo y pescado, puede ser utilizado para indicar el estado del equipo, así como evaluar el tiempo y temperatura durante el almacenamiento y distribución del producto (James, 1992).

7.5.2 Coliformes

En conjunto, los coliformes están representados por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella* (Seymour and Appleton, 2001). Son bacilos cortos que se han definido como bacterias aerobias o anaerobias facultativas que fermentan la lactosa con producción de gas. El grupo de

coliformes fecales incluye a los coliformes capaces de crecer a temperaturas elevadas (44.5°C) (Madigan *et al.*, 2004).

Sin embargo, la denominación coliforme y “coliforme fecal” no tiene validez taxonómica, estos términos sirven para designar a grupos de bacterias capaces de crecer en condiciones experimentales específicas (FAO/WHO, 1993). No todos los coliformes son de origen fecal, por lo que se hizo necesario desarrollar pruebas para diferenciarlos a efectos de emplearlos como indicadores de contaminación. Se distinguen, por lo tanto, los coliformes totales, que comprende la totalidad del grupo y los coliformes fecales aquellos de origen intestinal (Madigan *et al.*, 2004).

En un estudio realizado en Tabasco durante 2003, se evaluaron alimentos que se expendían en la calle, y se encontró que de los alimentos estudiados, el 9% tuvo altas cuentas de bacterias mesófilicas aerobias, siendo los tacos de pollo, el repollo y arroz guisado los alimentos mayormente contaminados. El grupo de los coliformes fecales estuvo presente en el 35% de los alimentos y se encontraron principalmente en salsa mexicana y repollo con cilantro (Borbolla, 2004).

7.5.3 Mohos y levaduras

Los mohos se definen como un grupo de hongos microscópicos; que se caracterizan por tener un cuerpo formado por estructura filamentosa con ramificaciones, que se conocen con el nombre de hifas. El conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción pudiendo propagarse por esporas flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa o manana y crecen formando colonias en un medio selectivo a 25°C (NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos).

Los mohos crecen sobre los materiales vegetales produciendo el deterioro de los mismos y pueden generar metabolitos secundarios que actúan como antibióticos

favoreciendo la prevalencia del moho frente a otros microorganismos, algunos de los cuales son tóxicos para plantas y animales (Jaimes, 1992)

En los vegetales, crecen un amplio grupo de microorganismos, en donde las bacterias suelen aparecer primero, luego las levaduras y finalmente los hongos filamentosos tanto saprofitos como patógenos (Richards *et al.*, 2004). Los géneros de hongos filamentosos que con mayor frecuencia se aíslan de las hortalizas incluyen *Aureobasium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phoma*, *Chaetomium* y en menor proporción *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Trichoderma* y *Ulocladium* (Török and King, 1991). La contaminación por estos agentes causa grandes pérdidas. Sólo en plantas de empaque se estiman pérdidas del 14 al 18% debido a los hongos, como por ejemplo, *Penicillium* spp., *Phytophthora* spp., *Phomopsis*, *Diplodia*, *Geotrichum*, *Botrytis* y *Colletorichum* se encuentran con frecuencia (Schirra, *et al.*, 2008).

Las levaduras, son microorganismos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular. Poseen un núcleo y se multiplican por reproducción sexual o asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenidas en un saco o asca (NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos).

Es importante la detección de estos microorganismos, ya que además de poder causar enfermedades a los consumidores de frutas y hortalizas, podrían ser capaces de afectar la calidad de éstas.

Las principales levaduras aisladas de las frutas pertenecen a los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon* y *Zygosaccharomyces* (Török and King, 1991).

El grupo de levaduras patógenas asociadas a alimentos es muy reducido. Estudios que permitieron el aislamiento de levaduras a partir de frutas y hortalizas, reveló que la mayor cantidad de especies del género *Ascomycetes* se encuentran sobre frutas, mientras que los miembros del género *Basidiomycetes* predominan sobre los vegetales (Richards, *et al.*, 2004).

7.6 Microorganismos Patógenos en Frutas y Hortalizas

En años recientes, se ha incrementado el número de brotes de gastroenteritis ligado al consumo de frutas y hortalizas donde la mayoría son de origen bacteriano (Bohaychuck, *et al.*, 2009). Long *et al.* (2002) reportaron que entre 1992 y 2000, 85(5.6%) de 1,518 de casos de ETAs en Inglaterra y Gales fueron asociados al consumo de ensaladas de frutas y hortalizas (Long, *et al.*, 2002).

En nuestro país se reportaron entre 1996 y 2007, 72 brotes por el consumo de frutas y hortalizas frescas. Entre los agentes bacterianos patógenos más importantes se encuentran a *C. perfringens*, *E. coli* enterotoxigénica y enteropatógena, *Shigella* sp., *C. jejuni*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.

7.6.1 *E. coli* O157:H7

Las cepas de *E. coli* que provocan enfermedades diarreicas se clasifican en grupos específicos basados en sus propiedades de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos, y serogrupos O:H diferentes. Estas clases incluyen: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (ESggEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Nataro, 1998).

E. coli O157:H7 se reconoció desde 1982 como patógeno de alimentos y agua contaminada (Abong'ó, *et al.*, 2008; Feng, 2001; Doyle *et al.*, 1993). Se estima que en

E.U.A. este microorganismo es causa de 73,000 enfermedades y 61 muertes al año (Deisingh and Thompson, 2004). Durante 1996 a 2000 en Reino Unido se reportaron 1,724,315 casos de los cuales 1,026 fueron causados por éste microorganismo (Goutam *et al.*, 2005).

La capacidad de esta bacteria de causar enfermedades en el humano es debido a varios factores de virulencia que tiene, entre los que se incluyen, la producción de verotoxinas (VT1, VT2 y algunas variantes de VT2), una proteína intimina, una proteína de la membrana externa que produce la lesión A/E la cual produce cambios en el citoesqueleto (Feng, 2001; Foster, *et al.*, 2003; Rivas, *et al.*, 2007), entre otros.

Los modos de transmisión de este patógeno incluyen: directa (persona a persona), vía fecal- oral, con el contacto de animales infectados o con su materia orgánica. En el caso particular de las frutas y hortalizas, éstas pueden ser contaminadas cuando son irrigadas con agua contaminada o por el contacto con suelos fertilizados con materia orgánica (Abdoul, *et al.*, 1993; Rivas, *et al.*, 2007; Abong'ó, *et al.* 2008). Se tiene documentado que este microorganismo es capaz de internalizarse en la partes aéreas de las plantas, teniendo a la raíz como punto de entrada (Bernstein, *et al.*, 2007).

La dosis infecciosa se ha calculado que puede ser tan baja como 10 a 100 células (Nataro, 1998), no obstante, otros autores han reportado rangos de entre 50 a 100 células. Los síntomas de la colitis hemorrágica incluyen una fase prodrómica que consiste en dolor abdominal con retortijones, seguida al día siguiente o a los 2 días por una diarrea no sanguinolenta que progresa en las 24 a 48 h siguientes a diarrea sanguinolenta y que dura de 4 a 10 días. La principal complicación después de la infección con esta bacteria es el síndrome urémico hemolítico (HUS), el cual afecta principalmente a los niños, que causa principalmente insuficiencia renal aguda (Deising and Thompson, 2004; Doyle *et al.*, 1997; Feng, 2001).

El producto fresco de origen vegetal no era considerado vehículo de transmisión de *E. coli* O157:H7 durante los años 90's, hasta que aparecieron reportes de brotes atribuidos a productos hortícolas mínimamente procesados, donde la contaminación de dichos productos ocurrió indirectamente (Delaquis, *et al.*, 2007). Entre dichos brotes, en 1991 se reportó en Massachusetts E.U.A., uno relacionado al consumo de sidra de manzana contaminada. Se cree que el fabricante pudo haber prensado manzanas contaminadas con tierra que contenía al microorganismo (Lucier *et al.*, 2006). En general, los brotes por este microorganismo han sido ligados al consumo de lechuga, espinacas, sidra, rábano y alfalfa principalmente (Parrilla *et al.*, 1993; Ilic *et al.*, 2008).

El brote más importante reportado por consumo de vegetales contaminados ocurrió en Japón en 1996, donde más de 11,000 personas resultaron afectadas, y a 6,000 de ellas se les confirmó que el agente causal era *E. coli* O157:H7 (CDC, 2006).

Se ha reportado la presencia de *E. coli* O157:H7 en productos que son de origen mexicano, entre los que se encuentran el cilantro, apio y col (Rangel, *et al.*, 2005; OMS, 1998). En septiembre de 1992 se registró a partir de hortalizas un brote causado por *E. coli* O157:H7 que afectó a cuatro personas. Este mismo microorganismo fue responsable de 30 casos debido al consumo de lechuga iceberg de origen mexicano (Avendaño *et al.*, 2002).

En México es poca la información que existe acerca de brotes asociados a este microorganismo, es por ello la importancia de la búsqueda de este en vehículos que se han reportado previamente como causa de brotes importantes a nivel mundial.

7.6.2 *Salmonella*

El género *Salmonella* comprende hasta el momento 2007 serotipos (Gallegos, *et al.*, 2008). Son bacilos Gram negativos, aerobios facultativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son móviles, con flagelos peritricos, y con una temperatura de

crecimiento óptima de 37 °C (D'Aoust, 2001). Son capaces de adaptarse a pH muy ácidos (Foster and Hall, 1990).

Este microorganismo cuenta con factores de virulencia que contribuyen a su patogénesis, como la habilidad para invadir células, poseer una cubierta completa de lipopolisacárido, capacidad para replicarse intracelularmente y posibilidad de producción de toxinas (Rodríguez and Peregrina, 1999).

La fuente de contaminación más importante de este microorganismo incluyen alimentos o agua contaminada con heces, ya que esta bacteria puede estar como estado portador en el tracto gastrointestinal de animales y humanos (Hu and Kopecko, 2003). Se ha aislado en diferentes huéspedes y ambientes, siendo los productos avícolas los principales reservorios (Labbé, R.G., and García, S., 2001; Gallegos, M.R., *et al.*, 2008). La vía de transmisión es fecal-oral y en raros casos se puede presentar la transmisión directa de persona a persona (Hu and Kopecko, 2003).

Virtualmente, todas las salmonelas son patógenas para los humanos. Son responsables de varios síndromes clínicos como gastroenteritis, septicemia y fiebre entérica (Rodríguez and Peregrina, 1999; Madigan *et al.*, 2004; Gallegos, *et al.*, 2008). Entre los síntomas principales de estas enfermedades se encuentran diarrea, fiebre, náusea, vómito, dolor abdominal, mialgias y el dolor de cabeza (Rodríguez and Peregrina, 1999).

La dosis infecciosa depende de cada serovariedad, del tipo de cepa, de las condiciones de crecimiento y la susceptibilidad del hospedero. De acuerdo con el Manual de Bergey la dosis infecciosa puede ser de 10^8 a 10^9 células, sin embargo existen datos más recientes que indican que de 1 a 10 células pueden construir una dosis infecciosa para humanos (D'Aoust, 1997). El periodo de incubación puede llegar a ser de 7 a 21 días después de la ingestión y 5 a 6 semanas pudieran tardar en aparecer los síntomas (Hu and Kopecko, 2003).

Las infecciones humanas con *Salmonella* pueden producir varias enfermedades clínicas, que incluyen la fiebre entérica (tifoidea), enterocolitis no complicadas, e infecciones sistémicas por microorganismos no tifoideos. La fiebre entérica es una enfermedad humana grave causada por esta bacteria, las manifestaciones clínicas de esta enfermedad aparecen después de un período de incubación que varía desde 7 a 27 días y pueden incluir diarrea, fiebre prolongada, dolor abdominal, dolor de cabeza y abatimiento.

La salmonelosis (enfermedad causada por especies de *Salmonella*) es una enfermedad autolimitante y la remisión de las características deposiciones diarreicas no sanguinolentas y del dolor abdominal suele ocurrir transcurridos 5 días desde el comienzo de los síntomas. Esta enfermedad ha ido en constante aumento como un problema de Salud Pública en Estados Unidos desde los primeros reportes tenidos en 1943 (Ukuku and Fett, 2004). En el 2005, 4,916 casos de salmonelosis fueron identificados por los laboratorios de referencia de Bélgica (47.1 casos por 100,000 habitantes) (Delhalle, *et al.*, 2008). Algunos estudios sobre productos frescos han revelado la presencia de una variedad de serotipos de *Salmonella* capaz de causar infección. La berenjena, tomate, coliflor, mangos, pimienta y lechuga fueron encontradas albergando este patógeno (Beuchat, 1996; Penteado, *et al.*, 2004; Berstein, *et al.*, 2007; Fu, *et al.*, 2008; Orozco, *et al.*, 2008).

En 1990, se reportaron al menos 9 brotes masivos de salmonelosis ligado a tomates, resultando en más de 1600 casos de ETAs y tres muertes (Hedberg, *et al.*, 1999; Shi, X, 2007). También, algunos brotes han sido ligados al consumo de mango, apio, berro, lechuga, col y hortalizas crudas (Weell and Butterfield, 1997, Sivapalasingam, *et al.*, 2003).

En un estudio realizado por Simonne *et.al.* (2004) demostraron que la comida mexicana representaba un problema de enfermedades transmitidas por los alimentos, ya que contiene ingredientes de alto riesgo como vegetales que se sirven frescos y sin

cocinar. También se demostró que el patógeno más común aislado fue *Salmonella* spp. con una frecuencia 47% (Simonne *et al.*, 2004).

Salmonella Poona fue reportada como causante de salmonelosis ligada con el consumo de melones en 1991, igual que en 2000, 2001, 2002, donde se involucraron directamente melones importados de México (Castillo, *et al.* 2004; Annous, *et al.*, 2005; Ukuku, *et al.*, 2004, Castillo, A., *et al.*, 2006, Ukuku and Fett, 2004, Richards and Beuchat, 2004), es por esto que este producto se ha convertido en un factor de riesgo para el consumidor.

Según datos de la FDA, hasta el 16 de julio del 2008 se reportaron 1,220 personas enfermas de salmonelosis en 42 estados en EUA y Canadá, en donde 224 personas fueron hospitalizadas. La FDA reportó en mayo del 2008 una alerta sobre un brote de contaminación por *Salmonella* Saint Paul en Nuevo México y Texas en donde tomates fueron identificados como posible vehículo; y fue hasta julio del mismo año cuando se afirmó que el chile jalapeño fue el causante del brote.

En México según el Boletín semanal de Vigilancia Epidemiológica, se reportaron hasta la semana 22 del 2009, 3272 casos de salmonelosis, siendo la principal bacteria causante de enfermedades gastrointestinales en nuestro país. El vehículo de transmisión no se tiene bien definido, pero hasta el momento no se tiene reportado un brote por esta bacteria en México, sin embargo como ya hemos mencionado, esta bacteria se asocia a vegetales y hortalizas de origen mexicano.

Conociendo la importancia epidemiológica que tiene *Salmonella* en el mundo, por otra parte, actualmente la mayoría de los estudios epidemiológicos van enfocados a la búsqueda de ésta en alimentos, es por ello que se tienen reportes en este año, de que en carne, queso, vegetales etc., se ha encontrado una alta incidencia de este microorganismo, lo cual nos indica que los alimentos mexicanos pudieran ser un

vehículo importante de transmisión de *Salmonella* (Gallegos *et al.*, 2008; Quiroz *et al.*, 2009).

En nuestro Laboratorio, se realizó un estudio evaluando la prevalencia de *Salmonella* en muestras de carne de cerdo que se expende en supermercados de Monterrey y su área metropolitana así como en heces de humanos, donde se encontró que el 10% de las muestras analizadas fueron positivas para esta bacteria (Puente, 2008).

7.6.3 *Campylobacter*

La familia *Campylobacteraceae* incluye 20 especies y subespecies del género *Campylobacter*, y 4 especies del género *Arcobacter* (Nachamkin, 1997).

Las especies de *Campylobacter* son bacterias Gram negativas móviles, con forma alargada y curvada, crecen en ambientes con reducida tensión de oxígeno, es decir, son microaerófilos. Estas bacterias son termófilas y muestran un crecimiento óptimo a 42 °C, aunque pueden crecer a 37 °C. Las especies de *Campylobacter* (*C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* y *C. upsaliensis*) han sido asociadas con múltiples enfermedades en animales y humanos (Ministerio de Salud, 2001).

Estos microorganismos no se adhieren a la superficie del tejido intestinal, sino mas bien utilizan su movimiento característico de sacacorcho como ventaja para poder desplazarse en la mucosa intestinal, además son capaces de producir una enterotoxina similar a la toxina colérica (Casillas, 1999).

Los reservorios principales de este microorganismo son el ganado, ovejas, aves de corral, perros y gatos (Scherer, *et al.*, 2006; Matsumoto, 2007).

Las rutas de transmisión incluyen el contacto directo con un animal infectado y el manejo de estos. Indirectamente, la infección puede ocurrir por el consumo de agua y alimentos contaminados (Hua and Kopecko, *et al.*, 2003), o que hayan tenido contacto con productos no contaminados, mediante contaminación cruzada (Beuchant, 1996; Altakruse, *et al.*, 1999; Evans, *et al.* 2003; De Cesare, *et al.*, 2003; Bakkenes, *et al.*, 2008).

La enfermedad que produce *Campylobacter* spp. se conoce como campylobacteriosis, la cual es una de las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor incidencia en los Estados Unidos. La dosis infecciosa de esta bacteria es relativamente baja, de 500 a 800 células. Al ser ingerido un alimento contaminado, el microorganismo se multiplica en el intestino delgado, invade el epitelio y causa inflamación que provoca manifestaciones clínicas. Los síntomas de la infección incluyen; fiebre elevada, dolor de cabeza, malestar general, náuseas, calambres intestinales y una profusa diarrea, frecuentemente con sangre (Madigan *et al.*, 2004).

En el Reino Unido, el número de reportes anuales por campylobacteriosis, tuvo un incremento de 32,636 a 56,420 entre 1991 y 2001, sin embargo, se tienen registros de la existencia de *Campylobacter* en 500,000 casos por año en Gales y Reino Unido (Brown, *et al.*, 2004).

Las dos especies de mayor importancia clínica como agentes causales de la campylobacteriosis humana son *C. jejuni* (más relacionada a carne de aves) y *C. coli* (asociada principalmente a la carne de cerdo) (Malavez, 2005; Wright, *et al.*, 2008). En los Estados Unidos, *C. jejuni* infecta entre dos y cuatro millones de personas cada año y es responsable del 99% de las enfermedades causadas por este género (CDC, 2002), en tanto que *C. coli* se relaciona con el 10% de los casos reportados (Wright, *et al.*, 2008).

A pesar de que esta enfermedad es autolimitante, pueden presentarse complicaciones tales como el síndrome de Guillain-Barre y el de Reiter (Brown, P.E., *et al.*, 2004).

Mishu y Blaser (1993) calcularon que, en los Estados Unidos la frecuencia anual del Síndrome de Guillain Barré precedido de la infección por *C. jejuni* varía desde 0.17 hasta 0.51 casos por 10,000 habitantes y supone de 425 a 1272 casos por año (Mishu and Blaser, 1993). De estos pacientes aproximadamente el 5 % muere, y el 20% que se recuperan sufre alguna discapacidad permanente (Hua and Kopecko, 2003).

Campylobacter es zoonótica, actuando muchos animales como reservorios de la enfermedad humana. Entre los reservorios principales se encuentran conejos, roedores, aves salvajes, ovejas, caballos, vacas, cerdos, aves de corral y los animales de compañía doméstica (Nachamkin, 1997).

Se ha informado de brotes en donde los alimentos implicados comprenden la leche fresca, las almejas crudas, la carne de pollo insuficientemente cocida y leche pasteurizada contaminada, entre otros (ICMSF, 1980; Yoda and Uchimura, 2006, Medeiros, *et al.*, 2008). Veinte brotes fueron reportados en el periodo de 1981 a 1990, a causa de esta bacteria, en donde se vieron afectados 1013 personas, y el vehículo causante de la mayoría de estos fue el consumo de leche fresca (Nachamkin, 1997).

Aun cuando las ensaladas de vegetales ocupan el segundo lugar de causa de campylobacteriosis después del pollo (Heaton and Jones, 2007), existe poca información sobre de la ocurrencia de este microorganismo en alimentos de origen vegetal. Hay estudios donde se ha demostrado que *C. jejuni* puede sobrevivir en una rebanada de sandía y papaya el tiempo suficiente para ser un riesgo para el consumidor (Beuchant, 1996). Kumar *et al.* (2001) encontraron en muestras al microorganismo de espinacas, rábano, perejil, cebolla verde, papa y champiñones a *C. jejuni* (Kumar *et al.*, 2001).

De la misma manera, en Canadá se evaluó la presencia de *Campylobacter* en 1564 muestras de 10 tipos diferentes de hortalizas teniendo incidencia de 3.3% en espinacas, 3.1% en lechuga, 2.7% en rábano, 2.5% en cebolla verde, 2.4% en perejil y 1.6% en

papa, siendo *C. jejuni* la especie más predominante con el 88%, seguida de *C. lari* (8%) y finalmente *C. coli* (4%) (Park and Sanders, 1992).

La información en nuestro país acerca de esta bacteria es limitada, y sobre todo en frutas y hortalizas, sin embargo existen pocos estudios epidemiológicos realizados en nuestro laboratorio en pollo crudo donde se lograron aislar 16 cepas de *C. jejuni/coli*, de 198 muestras analizadas (Solís, SL, 2008).

7.6.4 *Clostridium perfringens*

Los miembros del género *Clostridium* son bacterias anaeróbicas y esporuladas Gram positivas y móviles. Son considerados microorganismos aerotolerantes en comparación con otros microorganismos anaerobios, su crecimiento puede darse a pH de entre 5 y 8.3 (McClane, 2003), aun cuando su pH óptimo es de 6 a 7, es capaz de sobrevivir a pH tan bajo como el del estómago (Orsburn, B., *et al.*, 2008).

Las especies más importantes de este género incluyen a *C. botulinum*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. tetani* y *C. perfringens*, esta última causante de gangrena gaseosa o micronecrosis clostridial e intoxicación alimentaria (Altekruse, 1997).

Su hábitat natural es el suelo o el conducto intestinal de animales y humanos, donde viven como saprófitos (Rood and Cole, 1991; Heredia, *et al.*, 1997; Madigan *et al.*, 2004). Aunque existen reportes de que este microorganismo se ha transmitido por carne y productos avícolas (Lin and Labbe, 2003), también se ha asociado a ensaladas listas para el consumo, ya que el alto rango de respiración de estas puede crear un ambiente anaeróbico en los empaques, y así favorecer el crecimiento de algunas especies de *Clostridium* (Beuchat, 1996).

Este microorganismo es causante de diversas patologías en humanos y animales. En humanos es el principal causante de micronecrosis clostridial (gangrena gaseosa) y se ha

encontrado entre las primeras cinco causas de intoxicación alimentaria bacteriana (Heredia and García, 1999).

La enterotoxina de *C. perfringens* (CPE), cuya producción se da durante la fase de esporulación de la bacteria, es el principal factor de virulencia responsable de los síntomas de la intoxicación alimentaria (Heredia and Labbe, 2001; Rood and Cole, 1991; Lin and Labbe, 2003). Se ha determinado que <5% de los aislados de *C. perfringens* son realmente portadores del gen *cpe*, el cual codifica para la producción de la toxina (McClane, 1997, Tong and Labbé, 2003; Wen and McClane, 2004).

La intoxicación alimentaria se da después del consumo de alimentos contaminados con células vegetativas ($>10^5$ a 10^7 UFC/g), y después de un período de incubación de entre 8 y 24 h, se producen los síntomas clínicos, entre los que se incluyen diarrea y retortijones abdominales intensos, este tipo de intoxicación se caracteriza por no presentar vómito ni fiebre (Heredia and Labbé, 2001). Se ha demostrado que las células vegetativas y esporas pueden sobrevivir procedimientos de cocción en alimentos como la carne (Heredia, *et al.*, 1997).

La asociación de este microorganismo con las ETAs, ha existido desde hace mucho tiempo (Lin and Labbe, 2003). Los primeros reportes de esto datan de 1945, donde se describió como la primera causa de gastroenteritis en Estados Unidos (ICMSF, 1980). En el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos, se ha encontrado una incidencia de 16% en muestras de carne de cerdo y heces humanas recolectadas en hospitales de Monterrey y su área Metropolitana (Puente, 2008).

En Estados Unidos, durante 1983 a 1997, se consideró el tercer microorganismo más común, causante de brotes y casos de ETAs (Lin and Labbe, 2003). En la actualidad se tienen registrados 248,000 de casos aproximadamente cada año en E.U.A. (CDC, 2002; Orsburn, *et al.*, 2008).

En 1994, CDC reportó dos brotes de intoxicación alimentaria por el tipo A de *C. perfringens*, en el primero de este se produjeron 156 casos y 86 en el segundo. En donde el vehículo de transmisión fue carne de vaca, y la causa principal de la reproducción de este microorganismo en el alimento fue el abuso de temperatura (McClane, 1997; Kamber, *et al.*, 2007).

Al menos de 10 a 20 brotes por este microorganismo se han reportado anualmente en Estados Unidos en las pasadas dos décadas afectando a cientos de personas. Sin embargo, es probable que la mayoría de los brotes en donde se involucra a este patógeno, no hayan sido reportados, ya que rutinariamente no se busca en los alimentos a este patógeno (CDC, 2002). Esto puede ocurrir de la misma manera en nuestro país, en donde se ha reportado hasta la semana 22 del 2009, en el Boletín de Vigilancia Epidemiológica, 884 casos de intoxicación alimentaria, que comparados con enfermedades como la salmonelosis, es mucho menor la cantidad de casos reportados al año (Boletín Semanal de Epidemiología, 2009).

7.6.5 *Shigella*

Shigella es otro miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Es bacilo Gram-negativo, no formador de esporas, y no móvil (Lampel and Maurelli, 2003). Existen 4 especies dentro de este género agrupadas serológicamente en 39 serotipos basadas en sus antígenos somáticos O: *Shigella dysenteriae* (grupo A), *S. flexneri* (grupo B), *S. boydii* (grupo C) y *S. sonnei* (grupo D) (Maurelli and Lampel, 1997).

La virulencia de este microorganismo es multigénica, involucrando a los genes cromosómicos y codificados por plásmidos. Esta bacteria tiene la capacidad de invadir las células epiteliales del intestino, multiplicarse intracelularmente y propagarse de una célula a otra (Navarro, 1999).

La enfermedad que causa este tipo de bacterias se conoce como shigelosis o disentería bacilar, lo cual genera aproximadamente 140 millones de casos y 576,000 muertes anuales entre la población pediátrica en los países tercermundistas (Brooks *et al.* 1999). Anualmente, *Shigella* representa un estimado de 0.5 millones de casos de ETAs, causando 6231 hospitalizaciones y 70 muertes tan solo en Estados Unidos (Warren, *et al.*, 2007).

La dosis infecciosa se considera baja siendo de menos de 10 células (Wu, *et al.*, 2000). *Shigella* tiene como único huésped al hombre. La enfermedad se transmite de persona a persona por la vía fecal-oral (Terragno, *et al.*, 2007), en la mayoría de los casos la enfermedad se genera por la ingestión de alimentos o agua contaminada y, en el caso de los alimentos, el factor principal de contaminación, es la poca higiene personal de los manipuladores (Maurelli and Lampel, 1997).

Las hortalizas crudas contaminadas con heces humanas son el vehículo más común de shigelosis (Raffi and Lunsford, 1997). La bacteria también se ha aislado de otros productos como ensalada de papa (Law *et al.*, 1991), aderezo de frijol (CDC, 2000), ostras crudas (Reeve *et al.*, 1989; CDC, 1999). En México, Castillo *et al.*, en 2006, lograron aislar a *Shigella sonnei* y *S. flexneri* de jugo y superficie de naranja (Castillo *et al.*, en 2006).

En 1994 en los Estados Unidos, se reportó al CDC un brote de *S. flexneri* serotipo 6. Aunque no se confirmó, el alimento sospechoso contaminado fueron cebollas tiernas procedentes de México; 17 personas manifestaron síntomas de diarrea, 3 de las cuales fueron confirmados como casos de shigelosis (Maurelli and Lampel, 1997).

En 1998, un brote por *S. sonnei* en perejil y cilantro ocasionó que varias personas se enfermaran en 3 estados de E.U.A. (Avendaño *et al.*, 2002).

La lechuga fue el vehículo responsable de 2 brotes simultáneos en distintos campus de universidades de Texas E.U.A. donde los estudiantes enfermos habían consumido lechuga. En otro brote, 347 casos de gastroenteritis por *S. sonnei* fueron también asociados con el consumo de lechuga. En esa ocasión todos los restaurantes implicados en este brote habían recibido el producto de la misma compañía. El seguimiento del caso sugirió que los trabajadores de la planta empacadora fueron la fuente de contaminación (Beuchat, 1996).

Otros dos brotes en Estados Unidos por *S. flexneri* fueron reportados, las infecciones causadas se ligaron también al consumo de cebollines provenientes de México y los estudios revelaron que la posible contaminación de estos fue durante el empaquetamiento, en uno de los brotes se reportaron 17 personas con síndromes de diarrea, de los cuales solo 3 fueron confirmados como casos de shigelosis (Beuchat, 1996).

Durante Julio y Agosto de 1998; ocho restaurantes se asociaron a brotes con shigelosis causados por *S. sonnei* en Estados Unidos y Canadá. La fuente fue el consumo de apio proveniente de Baja California, México. En este brote 208 personas, enfermaron aunque sólo 48 casos fueron confirmados (Naimi *et al.*, 2003).

En mismo año, se reportaron numerosos casos de *S. sonnei* en los Estados Unidos y Canadá, en los que se implicó al perejil fresco proveniente de México. En septiembre del mismo año se presentó otro brote por cilantro proveniente de la misma compañía agricultora, en México (FDA, 1998).

A su vez uno de los pocos reportes que se tienen con respecto a brotes en nuestro país asociado a esta bacteria, es el que el CDC reportó en 1988, en donde 17 personas enfermaron a causa del consumo de alimentos en Cancún, México. Tres de los pacientes desarrollaron Síndrome Urémico Hemolítico y el microorganismo aislado se trató de *Shigella dysenteriae* tipo 1.

En datos más recientes en nuestro país, según lo reportado por el Boletín de Vigilancia Epidemiológica hasta la semana 22 del año 2009, se confirmaron 243 casos de Shigelosis (Boletín Semanal de Epidemiología, 2009).

7.6.6 *Listeria*

El género *Listeria* pertenece a la sub rama de *Clostridium* junto con *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Brochothrix* (Rocourt and Cosart, 1997). Incluyen 7 especies (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*) de las cuales *L. monocytogenes* es el único patógeno para el humano. Sin embargo, se ha demostrado que *L. ivanovii* y *L. seeligeri* contienen factores de virulencia capaces de causar enfermedad en los animales (Donnelly, 2001; Callejo, *et al.*, 2008). Además se ha reportado que puede estar presente *L. innocua* en alimentos (Beuchat, 1996), que aunque no es patógena, se ha utilizado como indicador de condiciones favorables para el desarrollo de la especie patógena *L. monocytogenes* (Oravcová, *et al.*, 2008).

L. monocytogenes es un bacilo Gram-positivo, no formador de esporas, anaerobio facultativo que crece de 0.4 a 50°C (Pal, *et al.*, 2008), es catalasa positivo y oxidasa negativo y expresa β -hemolisinas. Posee un flagelo que le sirve para su movilidad (Faber and Peterkin, 1991; Callejo, *et al.*, 2008).

L. monocytogenes es un microorganismo ubicuo en el ambiente, es decir, puede encontrarse con cualquier parte (Chen, *et al.*, 2003; Beuchat, 1996; Zhang and Farber, 1996). Debido a esto puede ser encontrado en las plantas de alimentos que han sido contaminados con suelo, agua, materia orgánica, etc. (Pappelbaum, *et al.*, 2008).

Entre los factores de virulencia que presenta esta bacteria se encuentran una hemolisina denominada también listeriolisina O; dos enzimas, la catalasa y superóxido

dismutasa y algunos compuestos de superficie referidos como la proteína p60 (Martínez, 1999).

L. monocytogenes es el agente causal de una enfermedad conocida como listeriosis. Los síntomas de esta enfermedad pueden aparecer de 1 a 9 días después del consumo del alimento contaminado y puede presentar 2 estados de severidad. Fase no invasiva, es más benigna y los principales síntomas son fiebre, fatiga, náuseas, dolor abdominal, vómito y diarrea. En el caso de la fase invasiva los síntomas se agravan hasta llegar a complicaciones como meningitis, septicemia, endocarditis e infecciones en el sistema nervioso, y pueden provocar aborto en mujeres embarazadas (Donnelly, 2001; Gorski, *et al.*, 2008).

CDC ha estimado que 2500 casos de listeriosis ocurren cada año (5 casos por millón de personas) resultando en 500 muertes ocurridas por este microorganismo tan solo en Estados Unidos (Chen, *et al.*, 2003; Gombas, *et al.*, 2003; Carrasco, *et al.*, 2007; Lianou and Sofos, 2007; Gorski, *et al.*, 2008).

Los alimentos donde se puede encontrar *Listeria* incluyen productos lácteos, carne, productos avícolas, vegetales y mariscos, entre otros (Farber, *et al.* 1989,1998; Chen, *et al.*, 2003, Cabedo, *et al.*, 2008). Los casos registrados de personas infectadas de listeriosis, son los individuos expuestos a dosis mayores de 10^3 UFC/g (Gombas, *et al.* 2003). Las personas más susceptibles a contraer la enfermedad son las mujeres embarazadas, personas de la tercera edad y las personas inmunocomprometidas (Kosa, *et al.*, 2007; Oravcová, *et al.*, 2008).

Hortalizas frescas o procesadas tales como ensaladas de col, brócoli, coliflor, ensaladas de papa, apio, tomate y lechuga también han sido la fuente causante de listeriosis (Beuchat, 1996; Pappelbaum, *et al.*, 2008). De Octubre del 1987 a Agosto 1988, se analizaron productos en supermercados del estado de Minnesota, en E.U.A.,

encontrándose de *Listeria* spp. en papa (25.8%) y en rábano (30.3%) (Heisick, *et al.*, 1989).

El consumo de vegetales crudos, ensaladas de repollo y champiñones salados ha sido asociado a numerosos casos de brotes de enfermedades por microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, *C. botulinum*, *Vibrio cholerae* y *E. coli* (Castro *et al.*, 2006).

Por otra parte, existen casos reportados de contaminación de *Listeria* spp. en productos provenientes de México, como en 1993, donde la FDA detectó que uno de 14 lotes de guacamole que se importó a E.U.A. dio positivo para *L. monocytogenes*, resultando en pérdidas para los productores aguacateros por la detención del producto (FDA, 1998).

Pocos estudios en México existen acerca de la prevalencia de *L. monocytogenes* en frutas y hortalizas, sin embargo, en nuestro laboratorio se evaluó la presencia de esta bacteria en muestras de carne de cerdo cruda que se expende en supermercados de Monterrey y su área metropolitana, así como en heces de pacientes que acudieron a consulta médica en tres Hospitales Generales de Zona (HGZ) del Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS) y el Hospital Regional Monterrey del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), en donde en un total de 100 muestras, 22 de estas (14.6%) fueron positivas para *L. monocytogenes* de las cuales 18 (11.8%) contenían el gen de la hemolisina (García, 2008).

7.7 Métodos de detección de microorganismos en Frutas y Hortalizas

Los análisis microbiológicos en la industria de alimentos demandan rapidez, precisión y la implementación de métodos prácticos para evaluar productos terminados, así como asegurar la eficacia en el proceso de control aplicado (Paulsen *et al.*, 2006).

Los métodos tradicionales reportados en las normas oficiales pueden ser simples y de bajo costo, sin embargo, presentan inconvenientes como la demora de obtención de resultados y la gran laboriosidad que estos requieren (Townsend *et al.*, 1998).

Algunas técnicas pasan por diversos procesos de enriquecimiento y por etapas laboriosas y complejas de manipulación, con tiempos prolongados de incubación hasta obtener los resultados finales. En otros casos, no existen normativas en México teniendo que utilizar aquellas reportadas por otros países, tal es el caso de la búsqueda de *Campylobacter* spp., donde las técnicas tradicionales establecidos por la FDA hacen difícil y delicado el cultivo de este microorganismo, debido a las exigencias particulares de incubación de los medios de enriquecimiento y del aislamiento (microaerofilia).

Asimismo, otro de los problemas que influyen en la detección de patógenos es la baja cantidad en que se encuentran presentes en el alimento (Huang, *et al.*, 2005). Además, se pueden presentar resultados falsos positivos o falsos negativos; con una interpretación incorrecta de la calidad de los productos alimentarios (Townsend *et al.*, 1998). Es así, que por un lado la gran demanda de trabajo al incrementarse el número de muestras a analizar y por el otro la necesidad de obtener resultados lo más rápido posible requiere de la implementación de métodos alternativos (Park, *et al.*, 2001).

Un gran número de métodos rápidos han sido validados con éxito para la determinación de algunos microorganismos indicadores así como patógenos específicos (Paulsen *et al.*, 2006), entre los que se encuentran aquellos que fueron utilizados en este trabajo, como el sistema TEMPO® y el sistema miniVIDAS®.

7.7.1 Sistema TEMPO®

Recientemente la compañía bioMérieux® ha desarrollado un sistema automatizado y computarizado llamado TEMPO®, el cual se basa en el principio de Número Más

Probable (NMP), teniendo éxito en la determinación de bacterias totales aerobias, coliformes totales, *E. coli*, *Enterobacter*, y mohos y levaduras (Paulsen *et al.*, 2008).

Las pruebas realizadas con esta nueva tecnología requieren únicamente de un pequeño frasco con medio de cultivo deshidratado y una tarjeta específica desechable asociada a cada prueba. Para un ensayo de rutina se inocula el medio de cultivo con la muestra a analizar. El medio inoculado se transfiere mediante el uso de la unidad de llenado (TEMPO “filler”) a la tarjeta, que contiene 48 pocillos de tres volúmenes diferentes. La tarjeta contiene 3 filas de 16 pocillos (pequeños, medianos y grandes) con grado logarítmico de volumen diferente entre cada uno de las filas. La tarjeta está diseñada para simular el método de Número Más Probable (MNP). La unidad de llenado sella dicha tarjeta para evitar riesgos de contaminación durante las manipulaciones posteriores (Figura 1). Posteriormente ocurre la incubación. Durante este tiempo los microorganismos presentes en la tarjeta degradan el sustrato del medio de cultivo y causan, para cada prueba, presencia o ausencia de fluorescencia, que es detectado por el lector (TEMPO “reader”). En función del número y el tamaño de los pocillos positivos, el sistema TEMPO calcula el número de microorganismos presentes en la muestra original de acuerdo con el cálculo basado en el método de NMP. Este método ha sido validado según la Norma EN ISO 16140, aprobada por la AFAQ AFNOR, validado por la AOAC en el 2006 y Norma Internacional NF ISO 4832 (Norme NF ISO 4832, 2006).

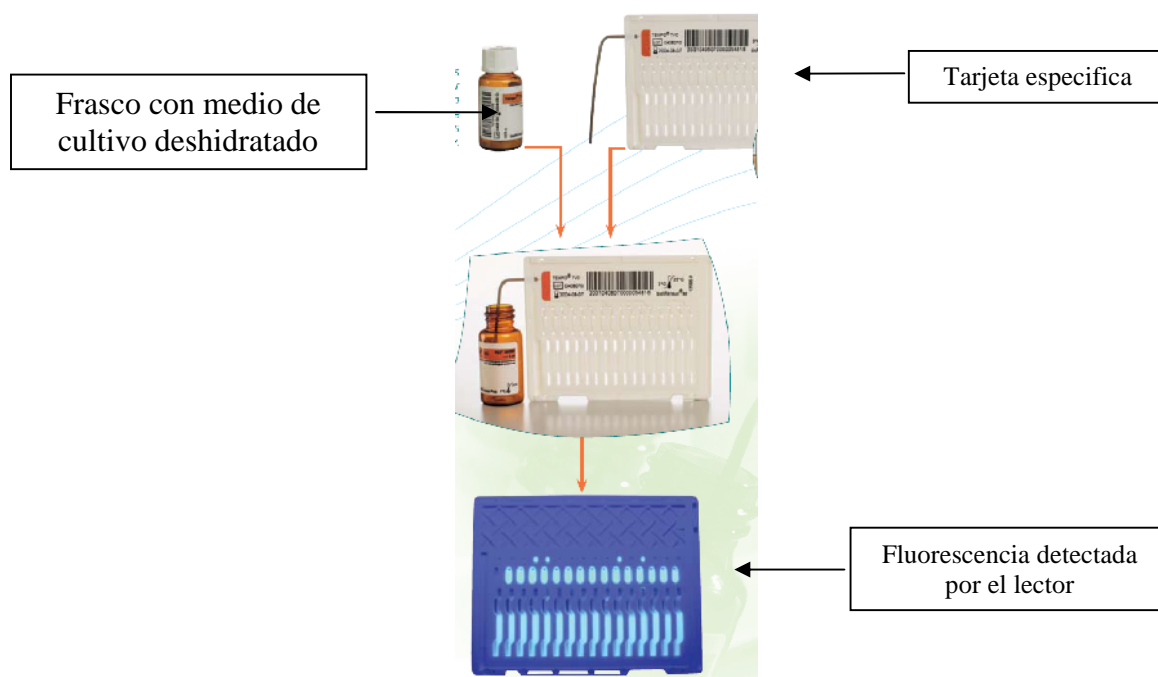


Figura 1. Esquematzación de la prueba del sistema automatizado TEMPO®

Actualmente este equipo ha sido empleado en diversos estudios, como en nuestro laboratorio en donde se han realizado comparaciones de éste y los métodos convencionales. Las matrices que se han utilizado para dichas comparaciones incluyen, carne molida y de pollo, pescado y lácteos, productos de panificación y vegetales, para la determinación de microorganismos indicadores, obteniendo repetitividad y reproducibilidad en los resultados siendo estadísticamente comparables (Paulsen, *et al.*, 2008, Cosby and Bayley, 2007; Crowley, *et al.*, 2009).

7.7.2 Sistema mini VIDAS®

En la década pasada se lograron avances muy grandes, en el desarrollo de técnicas para la detección de patógenos, basados en inmunoensayos como los métodos inmunoabsorbente ligado a enzimas (tecnología ELISA), los cuales están basados en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, puede ser medido

espectrofotométricamente. Estas técnicas de tamizaje pueden contribuir a acelerar la detección de los patógenos. Las ventajas de trabajar con estas pruebas incluyen la facilidad de manipulación y la alta sensibilidad que le da el enriquecimiento de la muestra, pues incrementa el número de microorganismos (Huang *et al.*, 2004). Una variante de esta técnica es la ELFA (Ensayo Fluorescente Ligado a Enzima). Esta tecnología es utilizada en el sistema automatizado mini-VIDAS® desarrollado por la compañía bioMérieux. Este sistema ha sido avalado por un gran número de organizaciones como AOAC y sistemas ISO como método alternativo para la detección de patógenos.

El sistema miniVIDAS® cuenta con dos dispositivos: un cono y su cartucho. El cartucho comprende 10 pocillos, uno de los cuales se destina a recibir la muestra, los ocho pocillos siguientes contienen los reactivos necesarios para la reacción y el último, es una cubeta de lectura en la que se mide la fluorescencia a una longitud de onda de 450nm (Fig. 2).

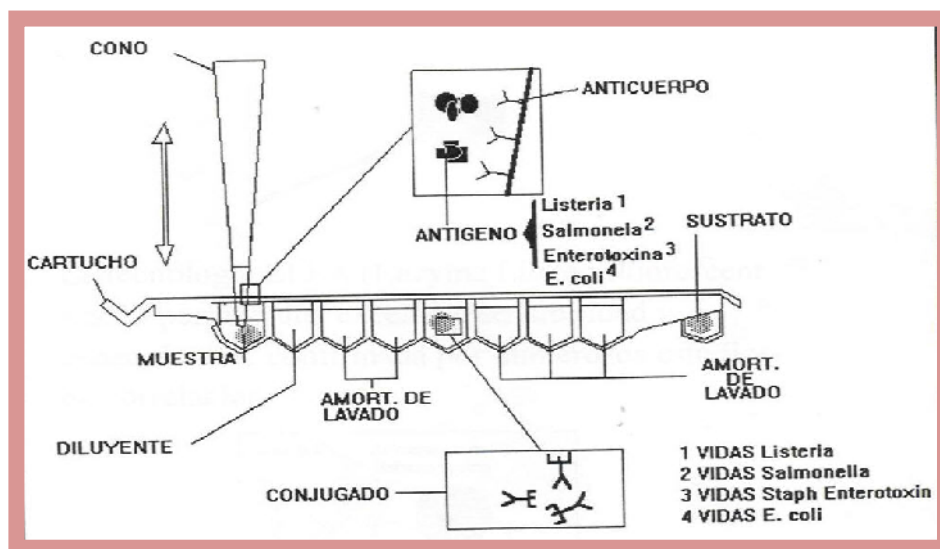


Figura 2. Esquematización de cartucho del sistema miniVIDAS®

El otro dispositivo es el cono, el cual, forma parte del pipeteo automático del aparato, conteniendo en su interior una pared recubierta con anticuerpos, antígenos u otros productos dependiendo del microorganismo a detectar, con este se mezcla y

transfieren los reactivos durante su operación. Éste aspira o expulsa líquido entre los pocillos del cartucho de reactivos con el fin de que la muestra se fije a su pared. La punta biselada hace que pueda perforar la hoja de aluminio que recubre los pocillos de los cartuchos de los reactivos. Al momento que la muestra reacciona con un anticuerpo o un antígeno conjugado con una enzima, forman un sándwich. La enzima inmovilizada hidroliza el sustrato en un producto final fluorescente, con previa excitación efectuada con la lámpara, el lector óptico lee esta fluorescencia y transmite las medidas al procesador central para su análisis (Manual de miniVIDAS®).

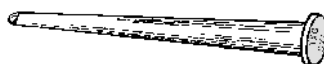


Figura 3. Esquematación de cono del sistema miniVIDAS®

Existen en el mercado sistemas validados del sistema miniVIDAS® para la detección de patógenos como *Campylobacter* spp., *E.coli* y *E.coli* O157:H7, *Listeria* spp, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y para la detección de las enterotoxinas de *S. aureus*, en la industria alimentaria.

Una variante reciente de este sistema es el método nombrado VIDAS UP, el cual, se basa en la unión de una proteína recombinante de un fago a la superficie de la bacteria, brindando una alta especificidad, la cual está dada por la co-evolución que existe entre los bacteriófagos y sus huéspedes. Además, ofrece ventajas sobre las técnicas moleculares, dentro de las que se encuentran el tiempo en el que se obtienen resultados, el uso de un medio de enriquecimiento barato (agua peptonada tamponada), una reducción del número de falsos positivos y falsos negativos, y un límite bajo de detección, entre otras. Se ha reportado que este método presenta inclusividad al ser analizadas 55 cepas de *E. coli* O157:H7, exclusividad al no presentar la existencia de reacciones cruzadas, al ser probada con 31 cepas de *E. coli* O157:H7, teniendo un límite

de detección de un rango de 8×10^2 UFC/ml (Manual de procedimientos VIDAS®UP bioMerieux).

El sistema VIDAS®LDUO fue desarrollado para la búsqueda de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* al mismo tiempo, además de haber sido validado por AFAQ AFNOR Certificación y la AOAC desde el 2007. Ha sido probado en diferentes variedades de matrices en los que se incluyen carne, pollo, productos del mar, lácteos y vegetales. De acuerdo a lo anterior, este tipo de pruebas da una ventaja en comparación con otras, por su validez y además que se obtienen los resultados rápidamente (Manual de procedimientos VIDAS®LDUO bioMerieux).

Para el caso de *Campylobacter* spp., se reportó un estudio en donde se evaluaron 100 muestras de carne de pollo, mediante el uso del protocolo VIDAS®CAM Combibag en paralelo con el método ISO 10272, obteniendo 49 muestras positivas con el primer método y 40 con el segundo (Manual de procedimientos VIDAS®CAM bioMerieux).

En este trabajo establecimos el nivel sanitario del perejil, cebolla cambray, melón, tomate, chile serrano y jalapeño mediante tecnologías convencionales así como nuevas (sistemas automatizados TEMPO® y miniVIDAS®), además de la técnica de PCR.

MATERIAL Y MÉTODO

8.1 Muestreo

Las muestras para la presente investigación se adquirieron en los municipios de Monterrey, San Nicolás de los Garza, San Pedro Garza García, Escobedo y Guadalupe del estado de Nuevo León, México; durante el período de Enero a Mayo del 2009.

Los lugares de muestreo fueron supermercados y mercados populares, donde se recolectaron aleatoriamente un total de 300 muestras que comprendían 50 de cada producto (perejil, cebolla cambray, melón, tomate, chile jalapeño y serrano), 25 de estas muestras fueron de supermercados y el resto de mercados populares. La selección de muestras no poseía ningún patrón en particular, estas fueron colocadas dentro de una bolsa y se transportaron en frío al laboratorio para ser procesadas en un lapso no mayor a 24 h después de su recolección.

8.2 Análisis microbiológicos

8.2.1 Preparación de la muestra para cuenta total de bacterias mesofílicas (CTV), coliformes totales (CT), mohos (M) y levaduras (L).

Se pesaron 25g de la muestra a analizar y se adicionaron 225 ml de agua peptonada a una bolsa estéril de plástico con filtro TEMPO® (bioMérieux). Se homogenizó por 1 minuto en un homogeneizador peristáltico (Stomacher Labeasy), hasta obtener una suspensión completa y homogénea. Posteriormente se procedió a la realización de diluciones decimales, para lo cual, a partir de la muestra original se tomó 1 ml y se colocó en un tubo con 9 ml de solución salina fisiológica estéril y se homogenizó. Así se realizaron hasta 3 diluciones decimales seriadas.

8.2.2 Determinación de Cuenta Total de Mesofílicos Aerobios (CTV) y Coliformes Totales (CT)

Para la realización de estos análisis se utilizó el sistema automatizado TEMPO® (bioMérieux). De las diluciones realizadas previamente se procedió a llevar a cabo la prueba de la siguiente manera; se transfirió 1.0 ml de las diluciones previamente realizadas a un vial con medio de cultivo deshidratado específico para cuenta de microorganismos mesofílicos aerobios o coliformes totales (bioMérieux); el cual previamente fue resuspendido con 3.0 ml de agua destilada estéril. El vial se mezcló durante 10 s en un agitador tipo vortex, y se colocó en el adaptador para viales y tarjetas. Ahí el TEMPO® “Filler” inoculó las tarjetas. Las tarjetas llenas fueron incubadas a 35 ± 2 °C durante 48 h para CTV (Cuenta Total de bacterias mesofílicas aerobias) y 30 ± 2 °C durante 24 h para CT (coliformes totales). Después de la incubación los resultados fueron leídos en la estación de lectura TEMPO® “Reader” (bioMérieux)

8.2.3 Determinación de mohos y levaduras

Para la determinación de mohos y levaduras se siguió la metodología de la NOM-111-SSA1-1994. De cada dilución previamente hecha, se tomó 1 ml y se sembró por difusión en agar papa dextrosa (PDA), adicionado con ácido tartárico (10%). Se homogenizó hasta lograr una completa incorporación del inóculo y se dejó solidificar. Una vez solidificado, se incubó a 25 ± 1 °C hasta 5 días. Pasado el tiempo de incubación se contaron las colonias de mohos y levaduras después de 3, 4 y 5 días. Al término del cual se seleccionaron aquellas placas que contenían de 10 y 150 colonias.

8.2.4 Detección de *Salmonella*

Para la identificación de *Salmonella* spp. se utilizó el sistema automatizado miniVIDAS® , utilizando el sistema LDUO (bioMérieux , 1993 R1.13), para lo cual se pesaron 10 g de muestra y se añadieron 90 ml de agua peptonada tamponada. Se incubó

por 16-20 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Después del tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 0.1 ml de la suspensión y se inocularon en 10 ml de caldo *Salmonella* Xpress (SX BioMérieux). Esto, se incubó a $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-26 h. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se transfirió 1 ml del caldo de enriquecimiento SX a un tubo vacío estéril y se calentó a baño María a $95-100^\circ\text{C}$ durante 15 ± 1 min (termizado). Una vez frío el cultivo, se procedió con la prueba VIDAS® SLM colocando 0.5 ml de la muestra termizada en el cartucho del ensayo. Los resultados positivos obtenidos se confirmaron tomando una asada a partir del caldo de enriquecimiento no termizado conservado a $2-8^\circ\text{C}$ y se sembró en los agares selectivos Xilosa Lisina desoxicolato (XLD), *Salmonella*-*Shigella* (SS), así como en el agar cromogénico chromID *Salmonella*. Dichas placas fueron incubadas a 37°C por 24 h y se seleccionaron las colonias presuntivas (agar XLD: colonias rosas con o sin centro negro, en agar SS: son colonias incoloras con centro negro y chromID *Salmonella*; colonias moradas). A estas se les realizaron pruebas bioquímicas convencionales como TSI (hierro triple azúcar), LIA (Agar Lisina Hierro), MIO (Movilidad Indol Ornitina), Citrato y Urea para su identificación. Además se realizó la confirmación mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) descrita más adelante.

8.2.5 Cuantificación de *Salmonella* spp

A las muestras positivas se les realizó su cuantificación utilizando la técnica descrita por Santos *et al.*, (2005), la cual consistió, en pesar 25g de la muestra, homogeneizándola en 225ml de agua peptonada tamponada. De esta dilución, 1 ml fue transferido a 3 tubos con 9 ml de agua peptonada tamponada (10^{-1}), de la misma manera se realizaron dos diluciones decimales seriadas más (10^{-2} y 10^{-3}). Todos los tubos fueron incubados a 37°C de 18-24 h. Después del tiempo de incubación, de cada tubo con su respectiva dilución se tomó una alícuota de 0.1ml y se transfirió a tubos con 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), incubándose a 42°C por 24 h. Cumplido el tiempo de incubación, de cada tubo se tomó una asada y se sembró en agar XLD y SS, incubados a 37°C por 24h. El crecimiento de estos agares con colonias características de *Salmonella*

fueron tomadas como resultados positivos para después comparar los resultados de las combinaciones resultantes mediante las tablas referidas en la NOM-112-SSA1-1994 .

8.2.6 Detección de *L. monocytogenes*

Para la identificación de *L. monocytogenes* se utilizó el sistema miniVIDAS® de BioMérieux utilizando el sistema LDUO para el cual, se pesaron 10 g de muestra y se homogenizaron con 90 ml de caldo LX (BioMérieux) en un homogeneizador peristáltico (Stomacher Labeasy) y se incubó a 30 ± 1 °C durante 22-26 h. Después del tiempo de incubación, se tomó 0.1 ml de la dilución primaria a un tubo con 6 ml caldo LX (BioMérieux) incubándolo por 22-24 h a $30^{\circ}\text{C} \pm 1$. Aproximadamente 1- 2 ml de este cultivo fue transferido a un tubo estéril y se calentó a baño María a $100\text{-}95$ °C durante 5 ± 1 min (termizado). Después de esto, una vez temperado el cultivo, se tomaron 500 µl y se agregaron al pocillo de muestra del cartucho VIDAS® LDUO. Para la confirmación de los resultados positivos obtenidos según el aparato, se tomó una asada del cultivo LX no termizado y se sembró en agar Oxford (OXA) y agar Ottaviani Agosti (OAA) las cuales se incubaron a 37°C por 48 h. Pasado el tiempo de incubación se seleccionaron las colonias características de *Listeria* (agar OXA: colonias negras con halo negro y en OAA: colonias azul turquesa con halo opaco) para la identificación mediante pruebas bioquímicas como tinción Gram, catalasa, movilidad, CAMP, hemólisis, reducción de nitratos, fermentación de carbohidratos como xilosa, manitol y ramnosa. La confirmación se realizó mediante PCR que se describe más adelante.

8.2.7 Determinación de *Shigella* spp

Para la determinación de *Shigella* se siguió la metodología propuesta en el BAM (Bacteriological Analytical Manual de la FDA capítulo 6), para lo cual se pesaron 25 g de muestra y se homogenizaron con 225 ml de caldo *Shigella* suplementado con novobiocina (5 µg/ ml). Se incubó 24 h a $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Pasada la incubación, se tomó una asada del cultivo y se sembró en agar MacConkey, para ser incubado por 24 h a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Las colonias presuntivas de *Shigella* en agar MacConkey (colonias rosa claro

translucidas con o sin bordes rugosos) se seleccionaron para la identificación mediante PCR descrita más adelante.

8.2.8 Cuantificación de *Clostridium perfringens*

Se basó en el método reportado en el BAM (Bacteriological Analytical Manual de la FDA capítulo 16), para lo cual, se pesaron 25 g de muestra y se homogenizaron con 225 ml de agua peptonada (0.1%). De ahí se tomó una alícuota de 1 ml y se realizaron diluciones decimales seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-6} en agua peptonada estéril. De cada una de las diluciones, se tomó 1 ml y se sembraron por difusión en el agar Triptosa Selenito Cicloserina (TSC) suplementado con cicloserina (400 µg/ml). Una vez solidificado el agar se agregó una segunda capa del mismo. Las placas se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ de 20 a 24 h bajo condiciones anaerobias (95% N, 5% CO₂). Se seleccionaron y contaron las colonias características las cuales eran negras y pequeñas. A dicha colonias se realizaron pruebas bioquímicas convencionales para su identificación, siendo éstas, tinción de Gram, fermentación “tormentosa” de la leche, movilidad, reducción de nitratos, licuefacción de la gelatina, fermentación de lactosa y producción de ácido sulfhídrico. Las colonias identificadas como *C. perfringens* se confirmaron mediante la técnica de PCR, descrita posteriormente.

8.2.9 Determinación de *Campylobacter*

Para la determinación de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. lari* se utilizó el sistema automatizado miniVIDAS® (bioMérieux, 1993 R13.13), para lo cual se pesaron 25 g de la muestra y se añadieron 225 ml de caldo de enriquecimiento Bolton (fórmula por litro, 10.0 g de peptona [DIFCO], 5.0g hidrolizado de lactalbúmina [Sigma], 5.0 g de extracto de levadura [DIFCO], 5.0g de NaCl [Sigma], 0.01g de Hemina [Fluka], 0.5 g de Piruvato Sódico [Sigma], 1.0g de Acido α-cetoglutarico [Sigma], 0.5g de Metabisulfito de Sodio [Sigma] y 0.6g de Carbonato sódico[J.T. Baker] con pH de 7.4 ± 0.2 , 5 % de sangre lisada, y suplementando con antibióticos, cefoperazona 20.0 mg/l, vancomicina 20.00 mg/l, trimetoprim 20.00 mg/l y cicloheximida 50.00 mg/l). El homogenizado se

incubó por 6 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en aerobiosis, y posteriormente se transfirió a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 42 h más bajo condiciones de microaerofilia (10% CO_2). Pasado el tiempo de incubación, se tomaron 1-2 ml del cultivo y se transfirieron a un tubo estéril, que se calentó a baño maría a $95\text{-}100^\circ\text{C}$ durante 15 ± 1 min (termizado). Una vez a temperatura ambiente, se agitó en un vortex con la finalidad de romper el coágulo formado. Después, se transfirieron 0.5 ml del cultivo al cartucho de VIDAS® CAM. Las muestras que el sistema VIDAS arrojó como positivas se seleccionaron para hacer una confirmación posterior. Para esto, se tomó una asada del caldo de enriquecimiento Bolton y se estrió en agar Campy Cefex (44 g de agar brucella [DIFCO], 0.5g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [J.T. Baker], 0.2g de bisulfato de sodio [Sigma], 0.5g de piruvato de sodio [Sigma], suplementándolo con cefaperazona 0.033 g/l, cicloheximida 0.2 g/l y sangre al 5% por litro). Las placas se incubaron por 48 h a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ en microaerofilia. Pasada la incubación se seleccionaron las colonias presuntivas, las cuales eran rosáceas, medianas, brillantes y se identificaron mediante pruebas bioquímicas como tinción de Gram, movilidad en fresco, TSI, hipurato de sodio, catalasa, oxidasa, reducción de nitratos y resistencia a ácido nalidíxico (30 μg).

8.2.10 Determinación de *E. coli* O157:H7

Para esto, se pesaron 10g de la muestra y se homogenizaron con 90 ml de agua peptonada tamponada pre-calentada a $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ adicionada con vancomicina (8mg/l) y se incubó durante 16-24 h. Se homogenizó el contenido de la bolsa y se transfirió una alícuota de 1-2 ml del enriquecimiento a un tubo estéril. Esto se calentó durante 5 ± 1 min a $95\text{-}100^\circ\text{C}$ (termizado), posteriormente se tomaron 0.5 ml y se transfirieron al pocillo de muestra en el cartucho VIDAS®UP. Las muestras positivas según el sistema VIDAS®UP, fueron inmuoconcentradas tomando 0.5 ml de la muestra no termizada, las cuales se colocaron en el pocillo de muestra del cartucho VIDAS®ICE. Posteriormente, del cartucho VIDAS®ICE se tomó una asada y se sembró en agares selectivos chromID O157:H7 adicionado con cefixima (C) [0.05mg/l] y telurito de potasio (T) [2.5mg/l] (bioMérieux) y agar MacConkey Sorbitol (SMAC-CT)

(bioMérieux). Las placas fueron incubadas por 18-24 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Las colonias sospechosas de *E. coli* O157:H7, las cuales en chromID O157:H7 fueron azul-verdosas, y en SMAC CT, translúcidas con centro café, se seleccionaron para la realización de pruebas bioquímicas convencionales como movilidad, indol, citrato, Voges Proskauer, descarboxilación y desaminación de lisina, ornitina y licuefacción de gelatina. También se les realizó serología por aglutinación en látex (OXOID) buscando el antígeno O157, además de confirmación por PCR descrita posteriormente.

8.3 Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la confirmación de las cepas aisladas se utilizó la técnica de PCR la cual se describe a continuación para el caso de *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7.

8.3.1 Extracción de DNA

Las cepas se sembraron en 5 ml de caldo soya tripticasa suplementado con extracto de levadura al 0.6%. Se incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente, se tomaron 0.5 ml del cultivo y se homogenizaron con 1 ml de amortiguador salino de fosfatos (PBS, 0.05 M). Se centrifugó a 3000 xg por 3 minutos y se realizaron 2 lavados con PBS y uno con agua miliQ. El precipitado fue resuspendido en 50µl de agua miliQ. Las muestras se diluyeron 1:10 con Tritón X-100 al 1%, y se calentaron en agua hirviendo por 5 min, después de lo cual, se enfriaron inmediatamente en un baño de agua con hielo. De allí, se tomaron 2 µl que sirvió como templado para la amplificación.

8.3.2 Amplificación

Se tomaron 2 µl del DNA extraído y se mezclaron con 23 µl de una mezcla de reacción que contenía 50mmol/l Tris-HCl (pH 8.5), 20 mmol/ l KCl, 3 mmol/ l MgCl₂, 0.05% albúmina de suero bovino, 0.25 mmol/ l (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0.25 µmol/ l de oligonucleótidos (Tabla 1) y 0.9 U de Taq polimerasa. La amplificación de la reacción se llevó a cabo en un termociclador (TermoHybaid) usando el protocolo reportado por Wang *et al.* 1997 que consistió en 94°C por 15s, 35 ciclos de 94°C por 3s, 50°C por 10s y 74°C por 35s y finalmente un ciclo de 74°C por 2 min y 45°C por 2s.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados y especie que identifican

Especies	gen blanco	PCR primers 5'-3'	Producto (pb)
<i>Listeria monocytogenes</i>	hemolisina	LM-1, CGGAGGTTCCGCAAAAGATG LM-2, CCTCCAGAGTGATCGATGTT	234
<i>Salmonella</i> spp.	invA	Sal-3, TATCGCCACGTTTCGGGCA Sal-4, TCGCATACATCGCAGCATC	275
<i>E. coli</i> O157:H7	hlyA	O157-3,GTAGGGAAGCGAACAGAG O157-4,AAGCTCCGTGTGCCTGAA	361
<i>Shigella</i> spp.	ipah gen	Shi-1, CTTGACCGCCTTTCCGATAC Shi-2, CAGCCACCCTCTGAGAGATA	610

Fuente Wang, R.F., 1999

8.3.3 Visualización

Los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 2% con una corriente de 120 V y finalmente teñidos con bromuro de etidio (50µg/ml) visualizado bajo luz ultravioleta.

8.4 Técnica de PCR para *Clostridium perfringens*

En este caso se utilizó el método reportado por Lin y Labbe (2003).

8.4.1 Extracción de DNA

El cultivo esporulado fue sembrado en 5 ml de caldo tioglicolato y se calentaron durante 15 min a 75°C. Se incubaron a 37°± 1°C por 24 h. Posteriormente se tomaron 1 ml del cultivo y se centrifugó a 5,000 x g por 15 min. Se realizaron dos lavados con solución salina fisiológica estéril. El precipitado, resuspendido en 200 µl de agua miliQ se calentó en agua hirviendo por 20 min, después de lo cual, se enfriaron inmediatamente en un baño de agua con hielo. De ahí se tomaron 10 µl que sirvió como templado para la amplificación.

8.4.2 Amplificación

Se tomaron 10 µl del DNA extraído y se mezclaron con 40 µl de una mezcla de reacción que contenía 5µl de Buffer 1X, 1µM de cada oligonucleótidos (Tabla 2), 0.2 mM de DNTP's, 1.5mM MgCl₂ y 2U de Taq polimerasa. La amplificación de la reacción se llevó a cabo en un termociclador (TermoHybaid) aplicando 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 55°C, 3 min a 72°C y uno final de 4 min a 72°C.

Tabla 2. Oligonucleotidos usados y especie que identifican

Especies	gen blanco	PCR primers 5'-3'	Producto (pb)
<i>Clostridium perfringens</i> (α-tóxina)	<i>cpa</i>	5'-GCTAATGTTACTGCCGTTGA 5'-CCTCTGATACATCGTGTAAG	324
<i>Clostridium perfringens</i> (enterotoxina)	<i>cpe</i>	5'-GGAGATGGTTGGATATTAGG 5'-GGACCAGCAGTTGTAGATA	233

Fuente Lin Y.T. y Labbe R

8.4.3 Visualización

Los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 2% con una corriente de 120 V y finalmente teñidos con bromuro de etidio (50µg/ml) y visualizados bajo luz UV.

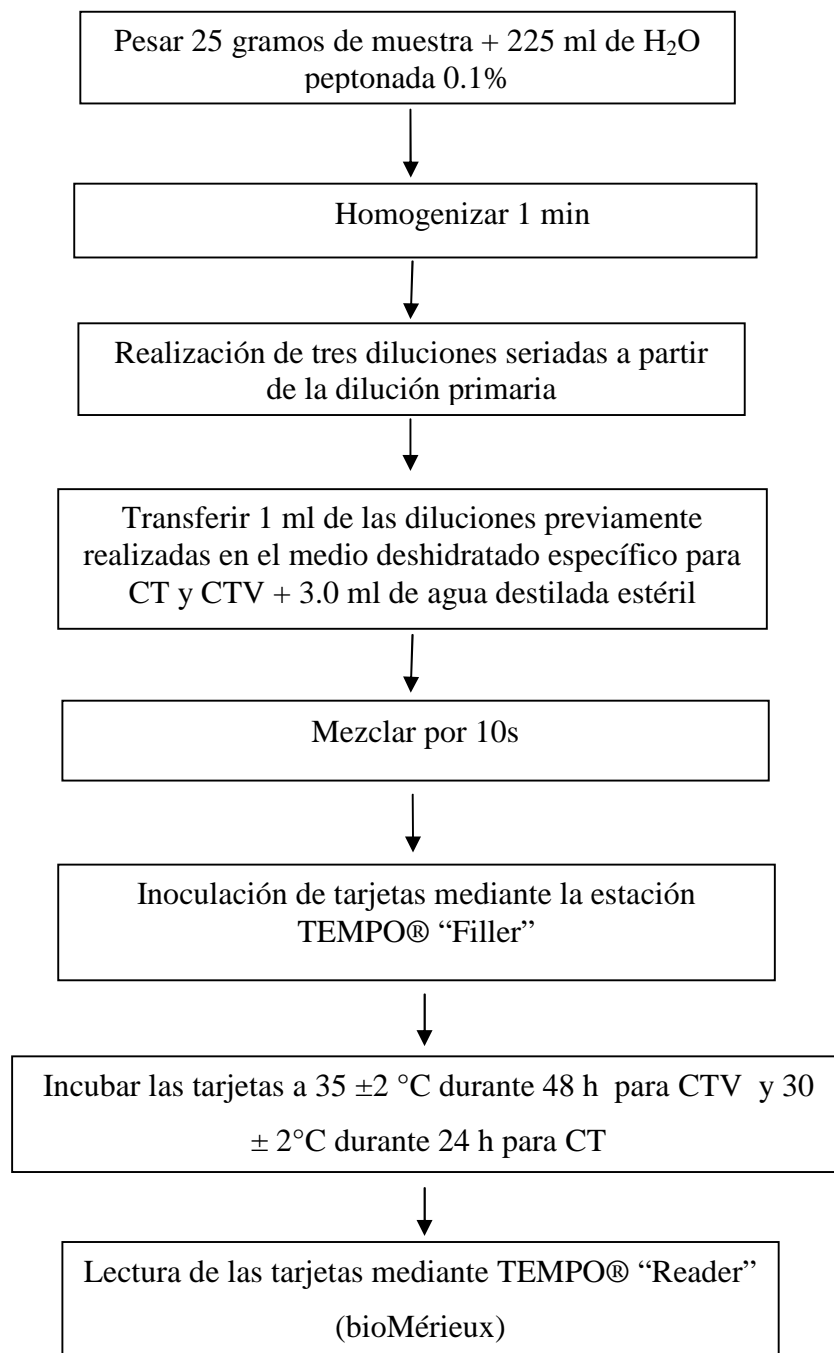
8.5 Análisis Estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas respecto a la carga microbiana entre los grupos indicadores en cada vegetal evaluado, se aplicó una prueba de ANOVA de una vía. En los análisis se consideró una significancia de 0.05 y una prueba de hipótesis estadística de dos vías.

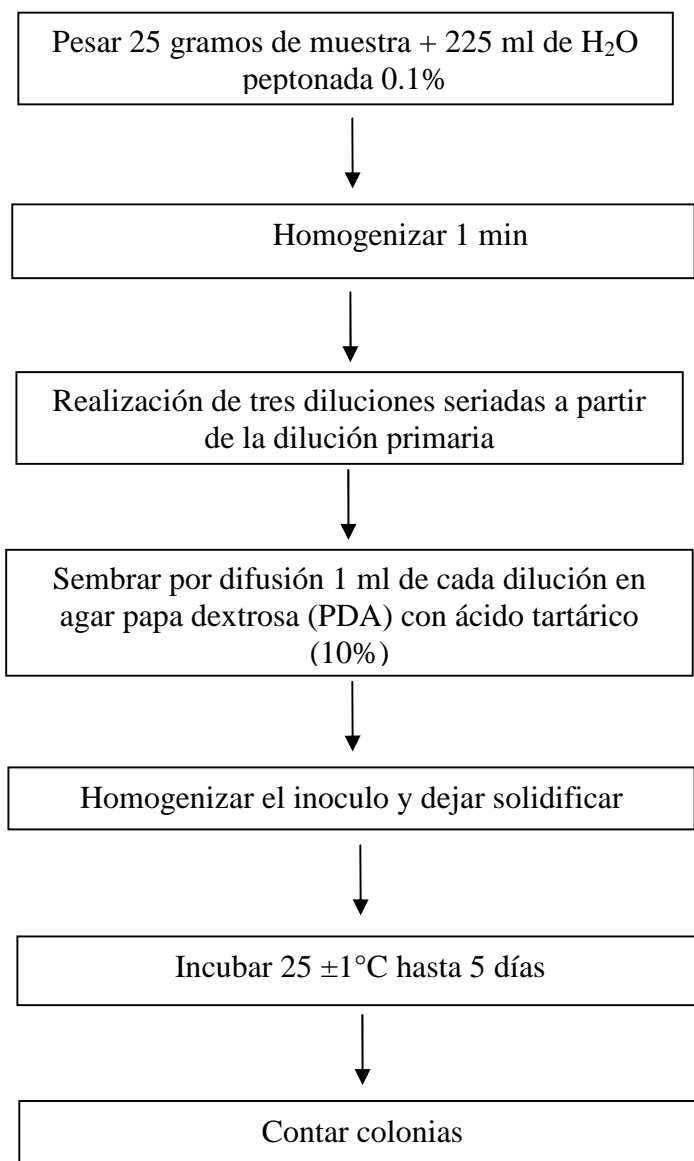
En el caso de los mercados y supermercados, se aplicó una *t* de Student para determinar si existe una diferencia significativa entre ellos, considerando la carga microbiana de los microorganismos indicadores. Todo lo anterior se realizó utilizando el paquete estadístico JMPv 7.0.

DIAGRAMAS DE FLUJO DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS

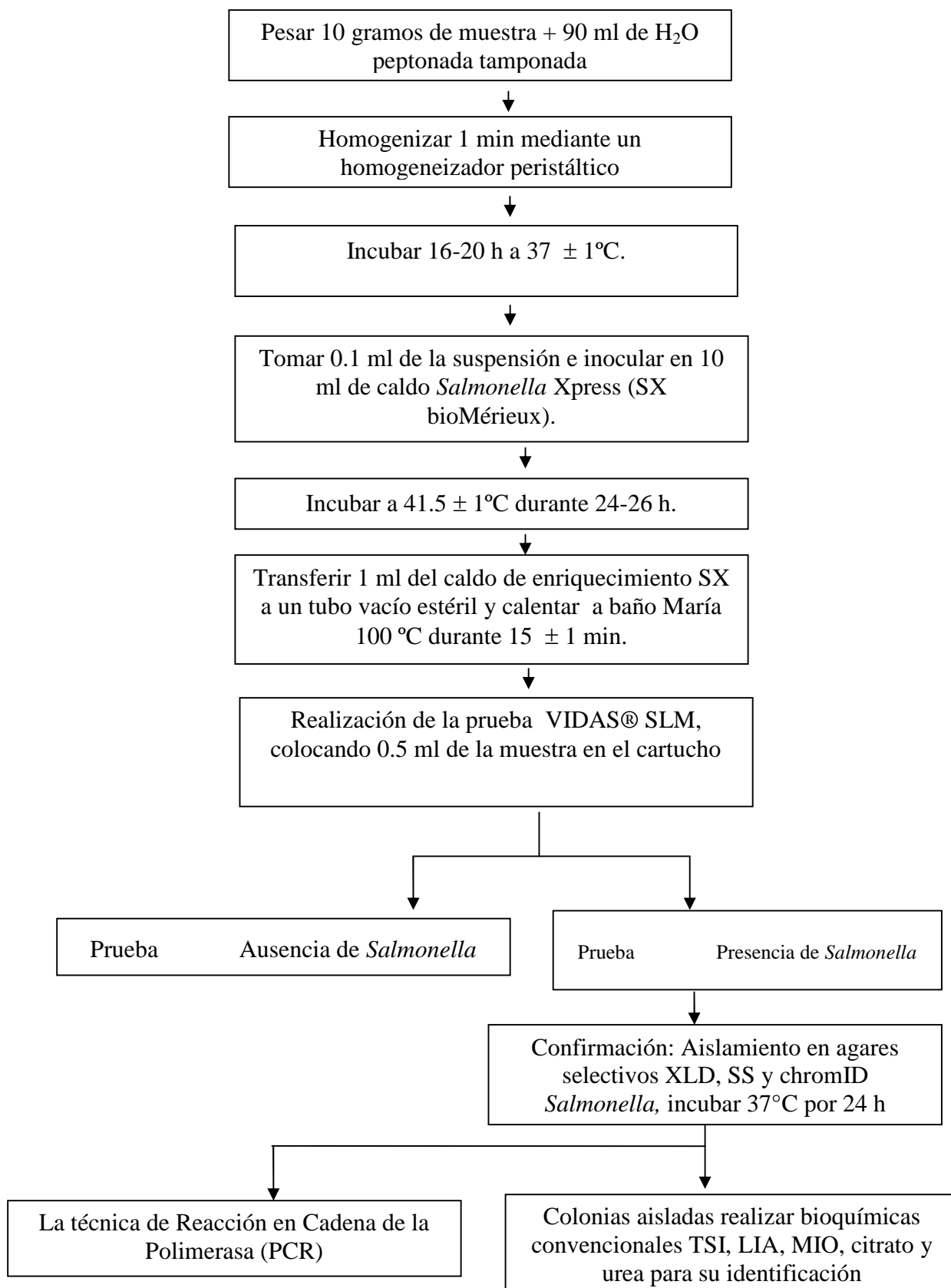
DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES MEDIANTE EL SISTEMA AUTOMATIZADO TEMPO



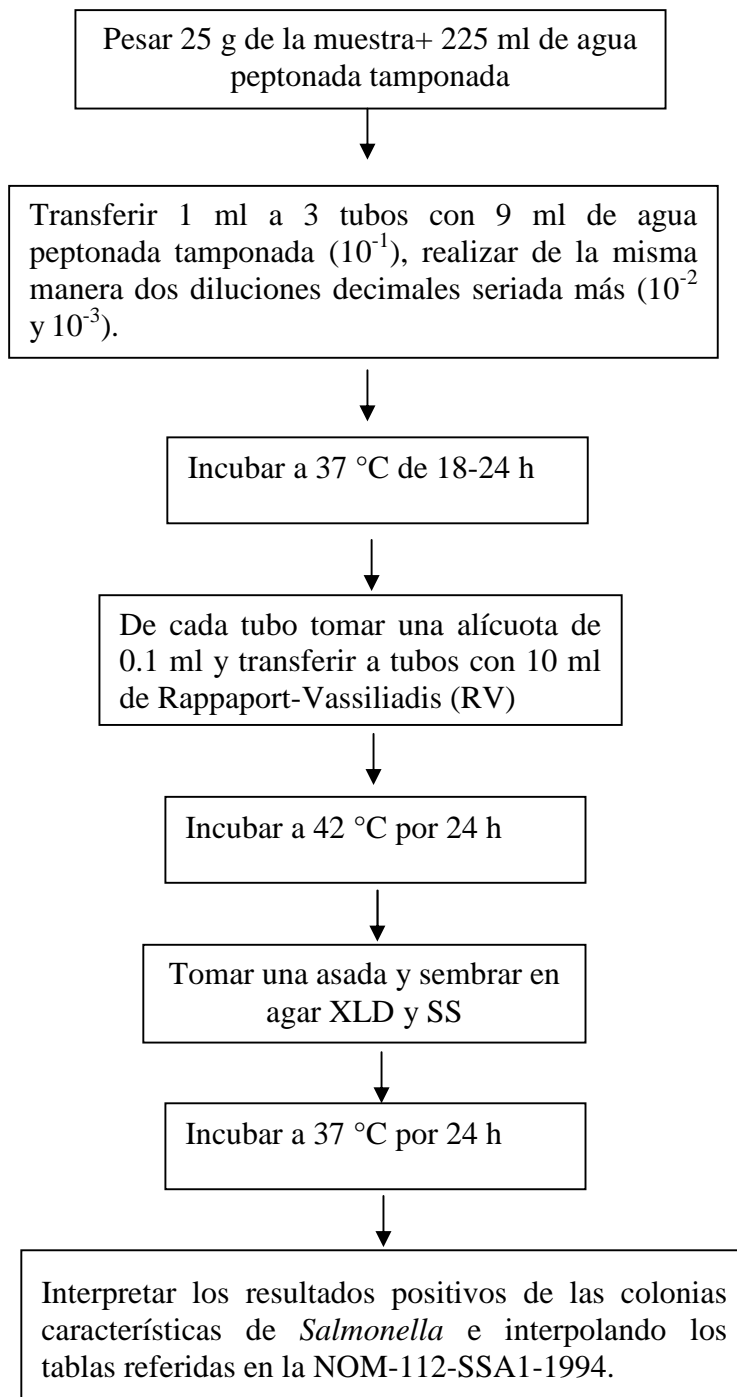
DETERMINACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS



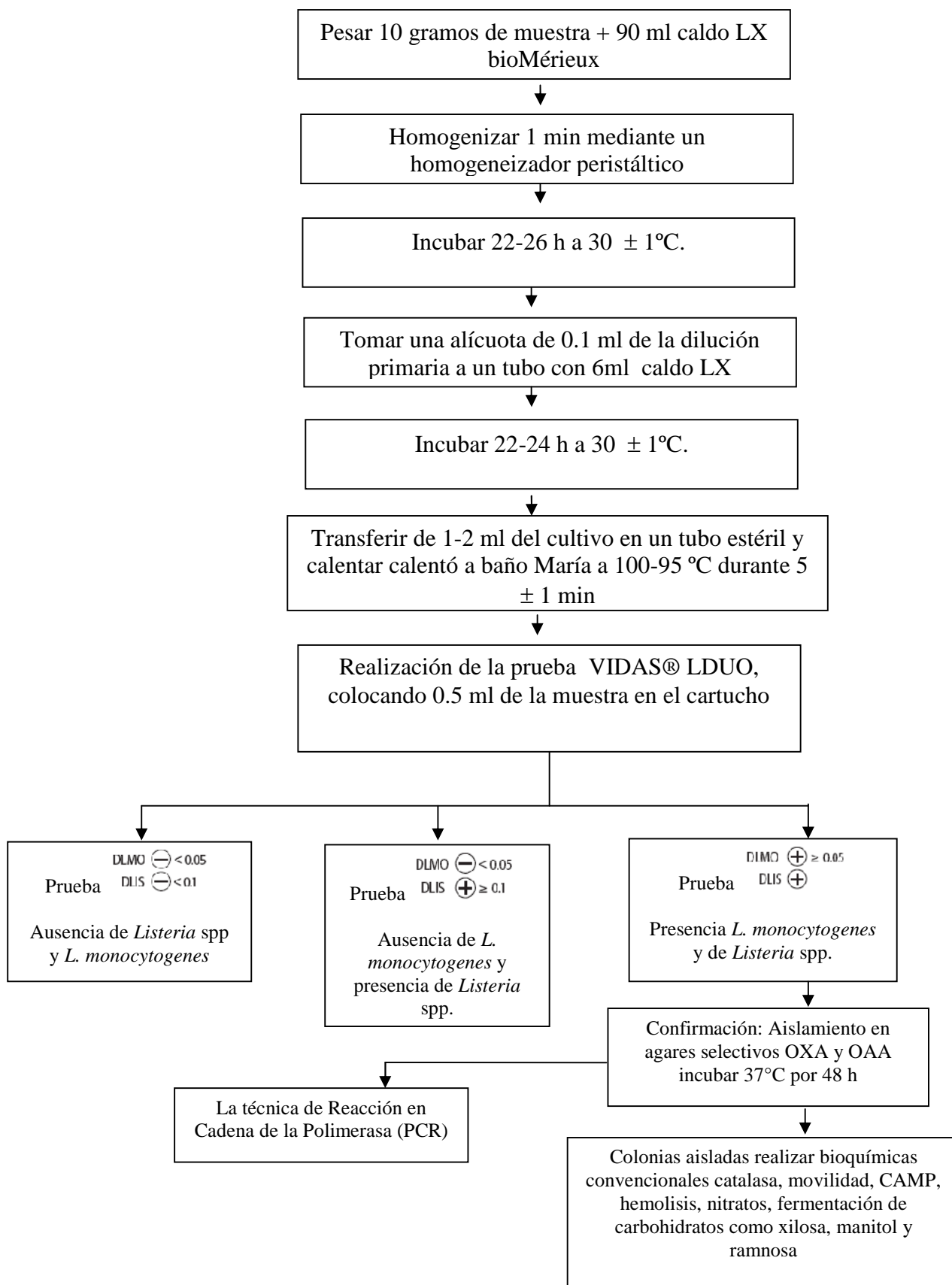
DETERMINACIÓN DE *Salmonella* spp. POR EL SISTEMA AUTOMATIZADO
miniVIDAS®

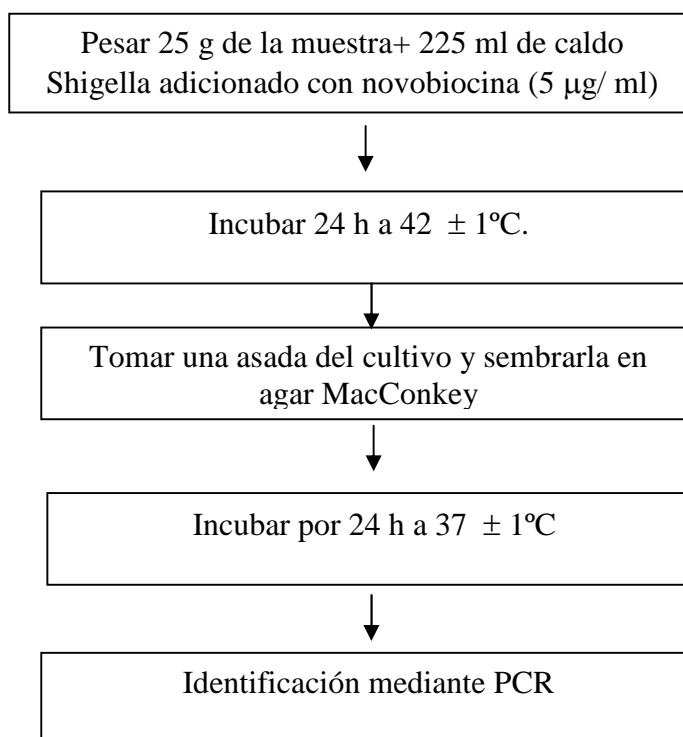


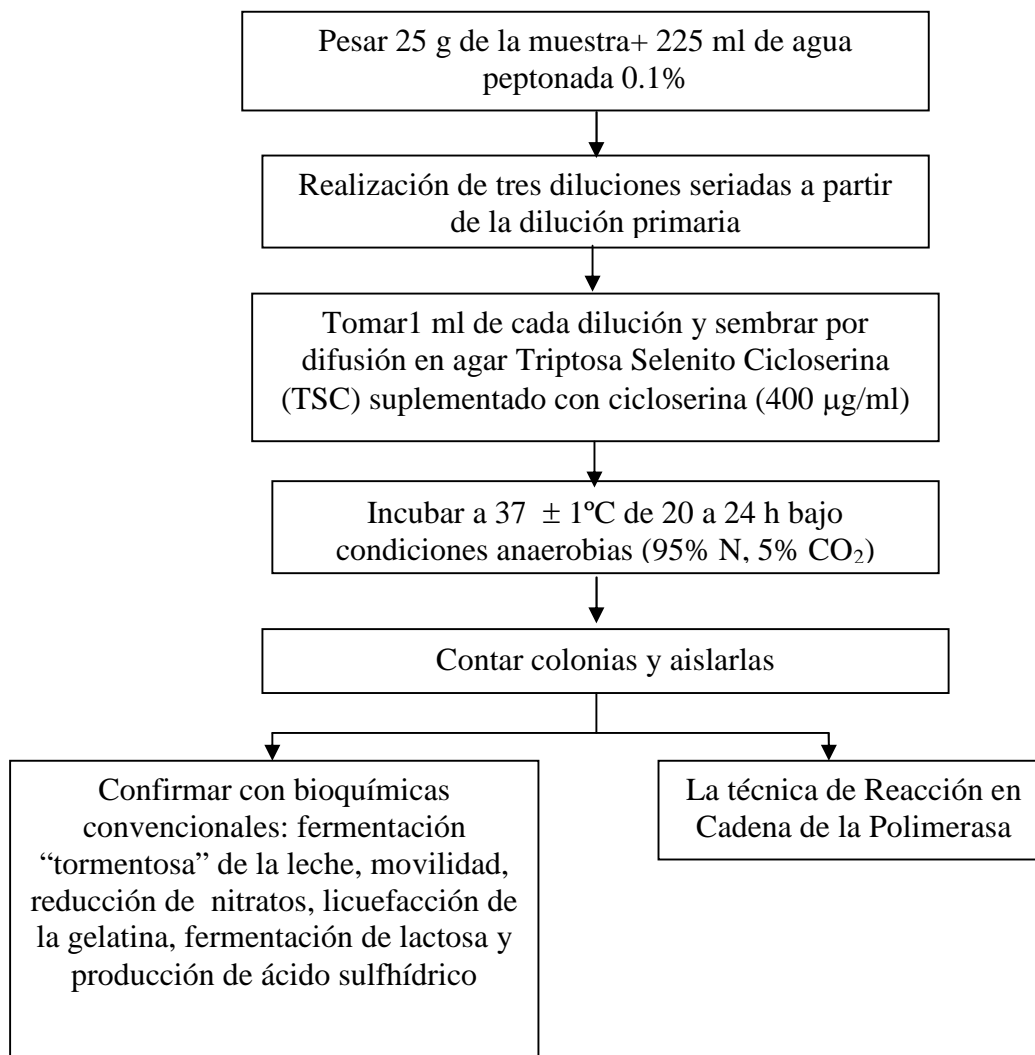
CUANTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp. POR LA TÉCNICA DE NÚMERO MÁS PROBABLE

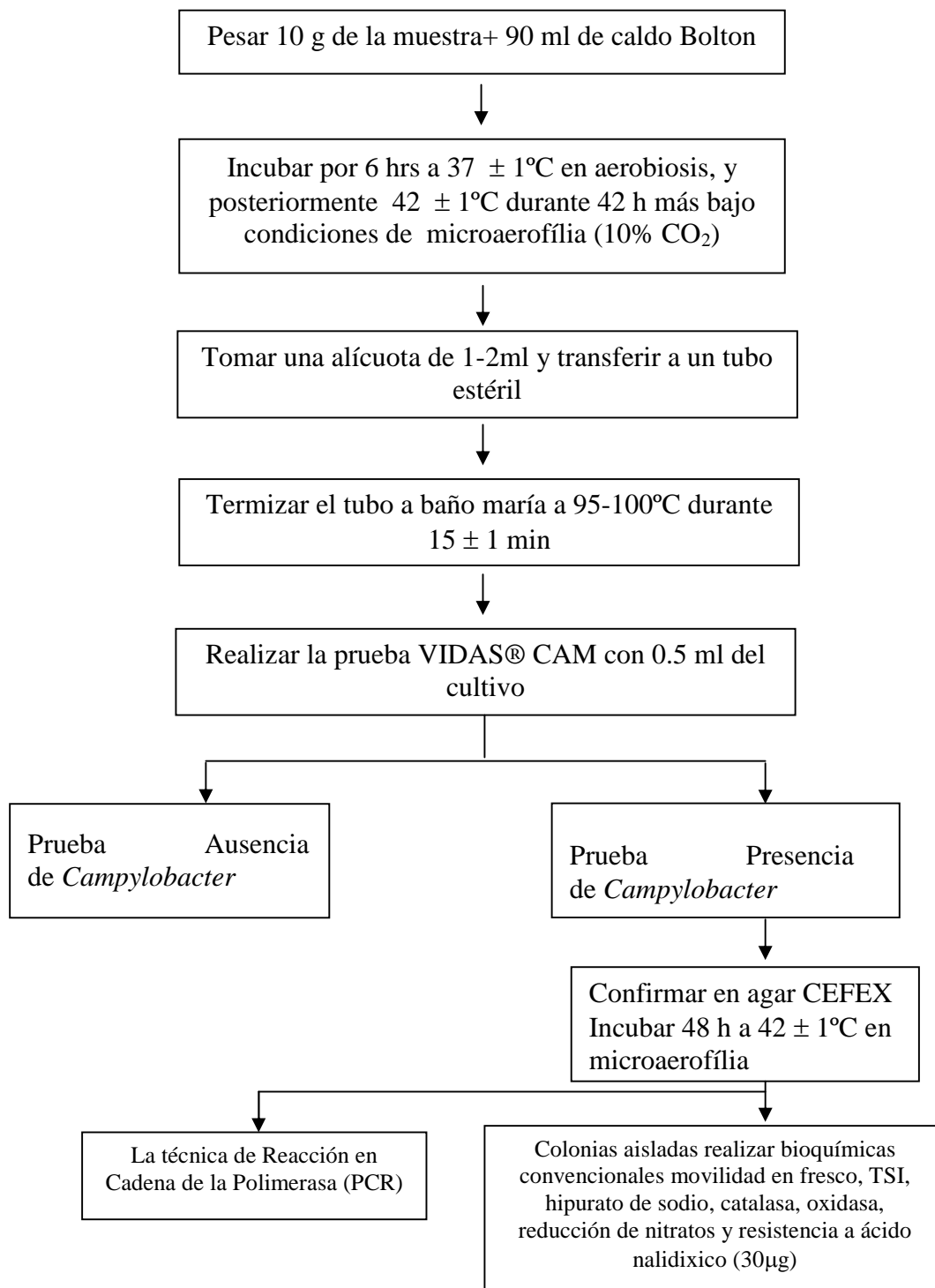


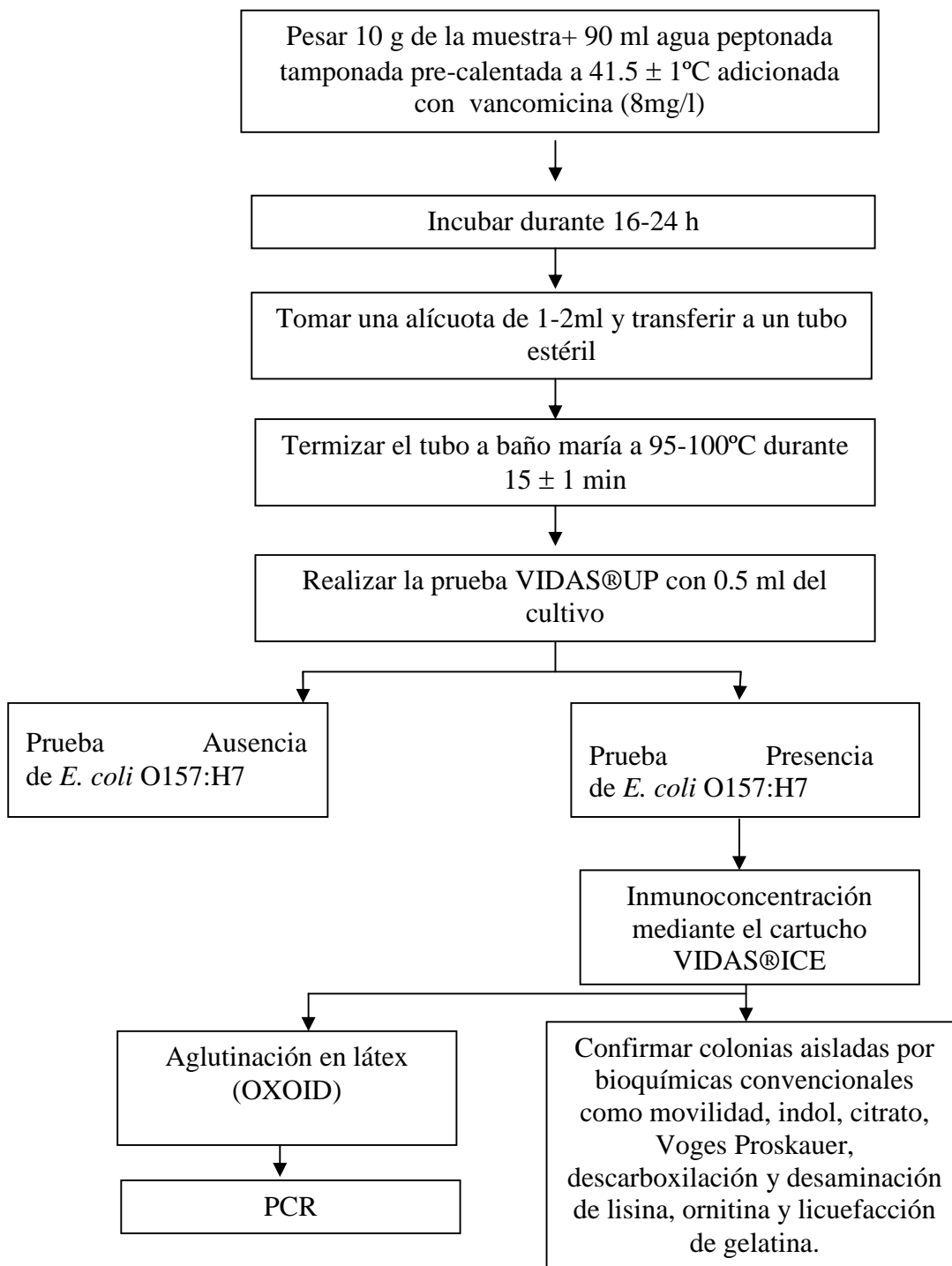
DETERMINACIÓN DE *Listeria spp.* y *L. monocytogenes* POR EL SISTEMA AUTOMATIZADO miniVIDAS®



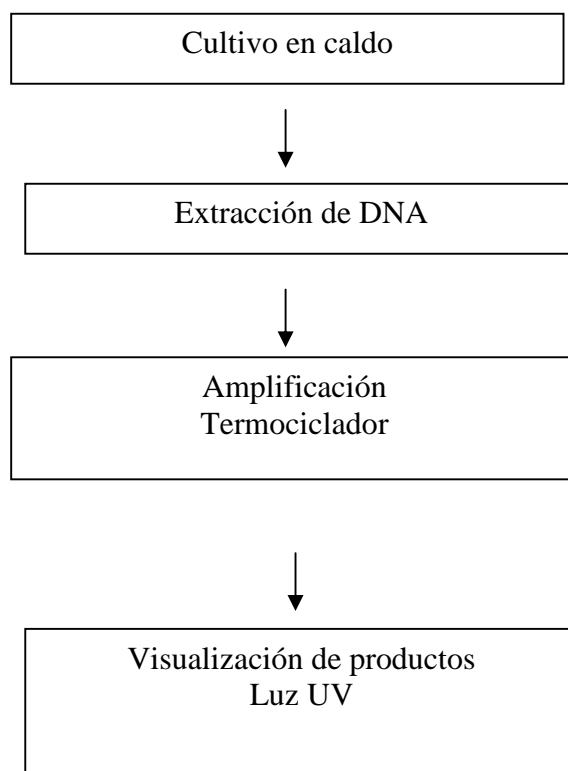
DETERMINACIÓN DE *Shigella* spp.

CUANTIFICACIÓN DE *Clostridium perfringens*

DETERMINACIÓN DE *Campylobacter* spp

DETERMINACIÓN DE *E. coli* O157:H7 por el sistema automatizada miniVIDAS®

TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA



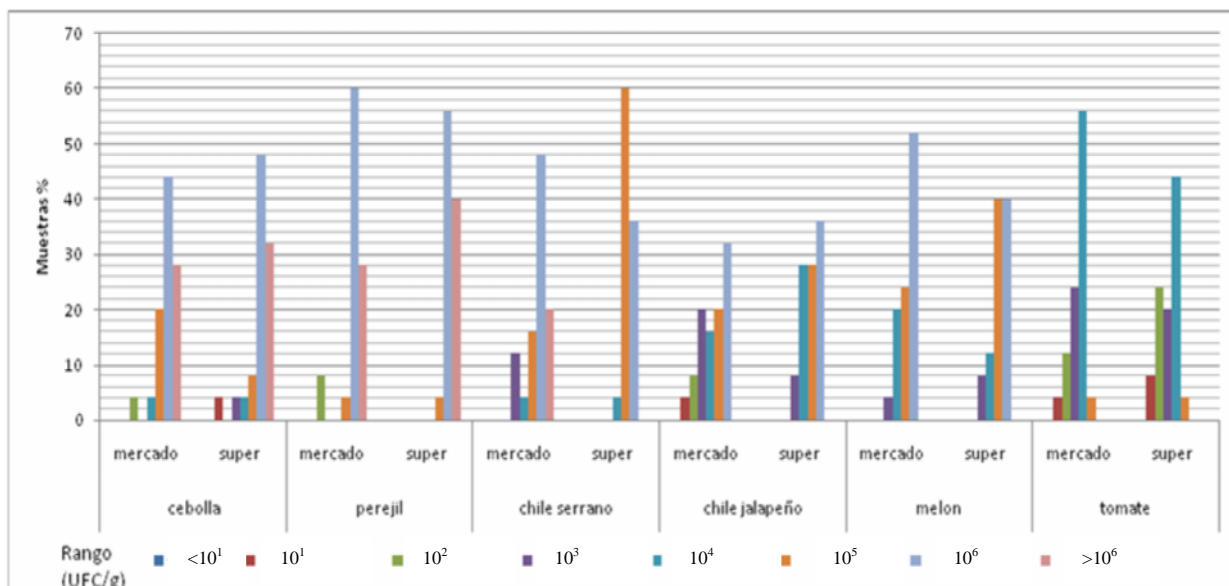
RESULTADOS

Un total de 300 muestras fueron recolectadas durante el periodo de Enero a Mayo del 2009. Los productos muestreados incluyeron perejil (50), cebolla cambray (50), melón (50), tomate (50), chile serrano (50) y jalapeño (50). Veinticinco de cada tipo de muestra fueron de supermercado y 25 provenían de mercados populares establecidos.

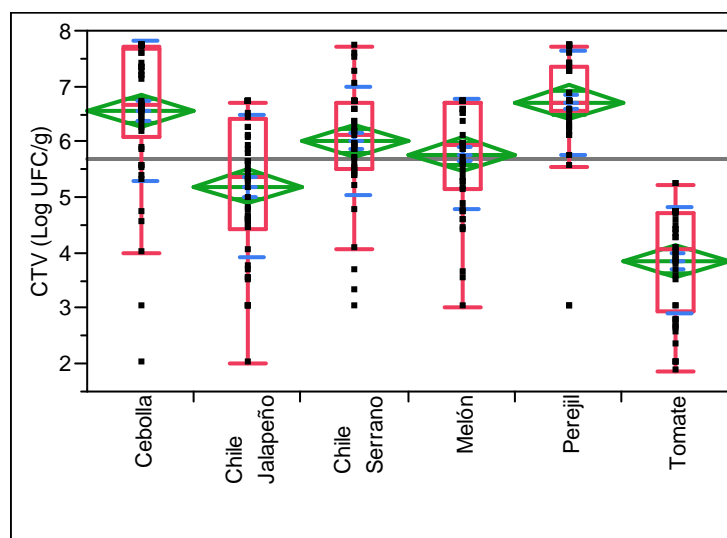
9.1 Cuenta Total de Microorganismos Mesofílicos Aerobios (CTV)

Según los resultados arrojados por el sistema automatizado TEMPO® bioMérieux para la cuenta de mesofílicos aerobios (CTV); el número de estos organismos en todas las muestra fueron elevados. La mayor parte de las muestras tuvieron cuentas mayores a 10^5 UFC/g (Gráfica 1), para la cebolla cambray, perejil, melón, chile serrano y jalapeño; excepto para el tomate, donde sus cuentas estuvieron por debajo de esta cifra. Según el análisis estadístico, existe diferencia significativa en la cuenta de mesofílicos aerobios dependiendo de los productos analizados (Gráfica 2). A su vez, no hubo diferencia significativa en las CTV según el sitio de muestreo, ya sea supermercados y/o mercados populares establecidos (Gráfica 3). En ambos sitios de recolección se presentaron cuentas mayores a 10^5 UFC/g para la mayor parte de las muestras (Gráfica 1).

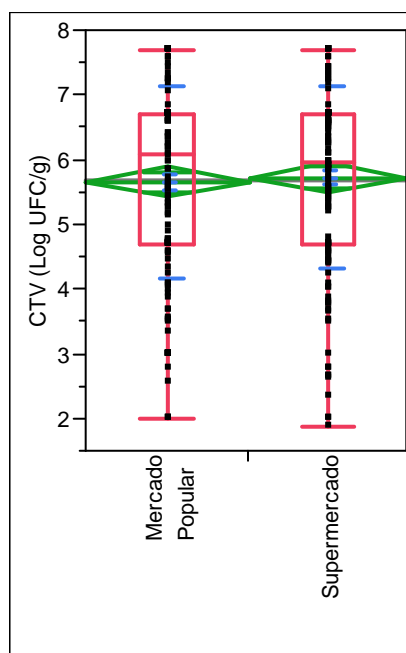
UFC/g	Número de muestras (%)					
RANGOS	Cebolla Cambray	Perejil	Chile Serrano	Chile Jalapeño	Melón	Tomate
<10	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
10^1	1(2)	0(0)	0(0)	1(2)	0(0)	3(6)
10^2	1(2)	2(4)	0(0)	2(4)	0(0)	9(18)
10^3	1(2)	0(0)	3(6)	7(14)	3(6)	11(22)
10^4	2(4)	0(0)	2(4)	11(22)	8(16)	25(50)
10^5	7(14)	2(4)	19(38)	12(24)	16(32)	2(4)
10^6	23(46)	29(58)	21(42)	17(34)	23(46)	0(0)
10^7	15(30)	17(34)	5(10)	0(0)	0(0)	0(0)
Total	50	50	50	50	50	50



Gráfica 1. Número de muestras agrupadas en rangos dependiendo de las cuentas de microorganismos mesofílicos aerobios (CTV) obtenidas de supermercados y mercados populares establecidos mediante el sistema automatizado TEMPO® bioMérieux para cada fruta y hortaliza analizado.



Gráfica 2. Distribución de la carga de microorganismos mesofílicos aerobios de frutas y hortalizas analizados por ANOVA. Puntos dentro de las cajas, representan el 50% de las muestras. Línea azul media del parámetro.

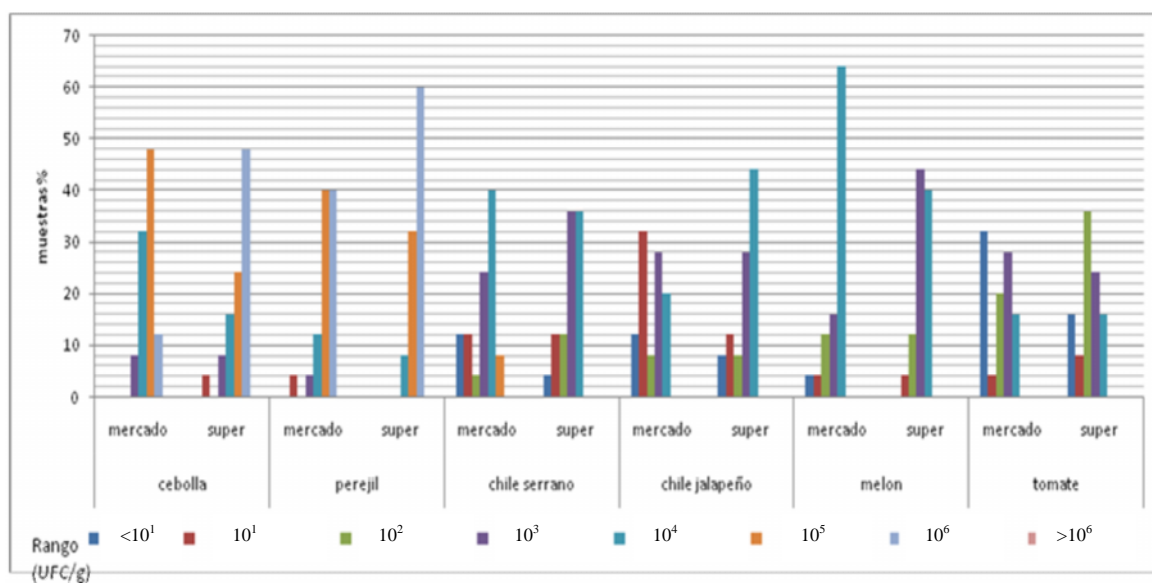


Gráfica 3. Distribución de la carga de microorganismos mesófilos aerobios analizados por ANOVA de frutas y vegetales procedentes de supermercado o mercados populares.

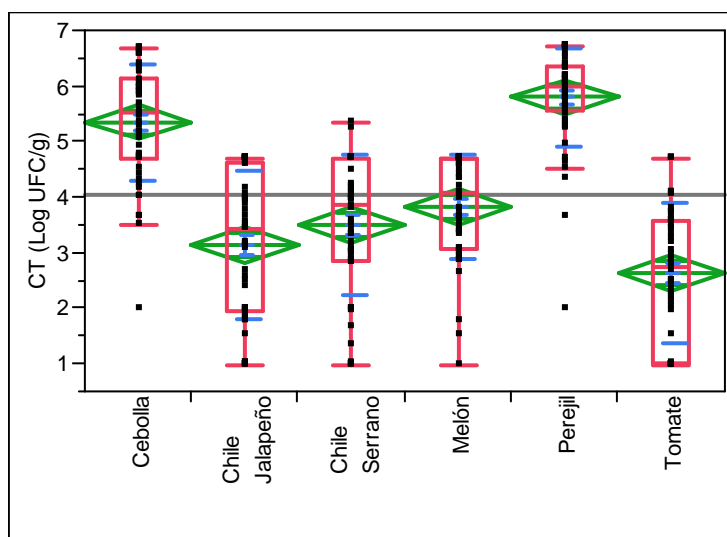
9.2 Coliformes Totales (CT)

Para realizar esta determinación se utilizó el sistema automatizado TEMPO® bioMérieux. La presencia de microorganismos coliformes totales (CT) fue muy variable teniendo desde <10 hasta 10^6 UFC/g. La cebolla cambray y el perejil fueron los productos que presentaron cuentas más elevadas que el resto de los analizados. Para el caso de las muestras de tomate se encontró que el 24% presentaron cuentas por debajo de 10 UFC/g. Según el análisis estadístico, existe diferencia significativa entre los resultados de las frutas y hortalizas analizadas (Gráfica 5). No existió diferencia significativa entre las muestras recolectadas con respecto al sitio de muestreo ya sea de supermercados y mercados populares establecidos (Gráfica 6). Sin embargo, muestras provenientes de centros comerciales presentaron cuentas más elevadas que las de mercados populares (Gráfica 4). La NOM-093-SSA1-1994 alimentos preparados marca sólo límite en el caso de coliformes fecales de no más de 100 NMP/g para ensaladas verdes, crudas o de frutas.

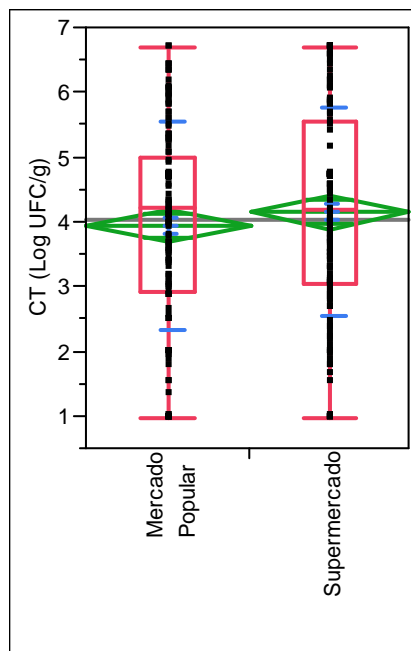
UFC/g	Número de muestras (%)					
RANGOS	Cebolla Cambray	Perejil	Chile Serrano	Chile Jalapeño	Melón	Tomate
<10	0(0)	0(0)	4(8)	5(10)	1(2)	12(24)
10 ¹	1(2)	1(2)	6(12)	11(22)	2(4)	3(6)
10 ²	0(0)	0(0)	4(8)	4(8)	6(12)	14(28)
10 ³	4(8)	1(2)	15(30)	14(28)	15(30)	13(26)
10 ⁴	12(24)	5(10)	19(38)	16(32)	26(52)	13(16)
10 ⁵	18(36)	18(36)	2(4)	0(0)	0(0)	0(0)
10 ⁶	15(30)	25(50)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
10 ⁶	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Total	50	50	50	50	50	50



Gráfica 4. Número de muestras agrupadas en rangos dependiendo de las cuentas de coliformes totales (CT) obtenidas de supermercados y mercados populares establecidos mediante el sistema automatizado TEMPO® bioMérieux para cada fruta y hortaliza analizado.



Gráfica 5. Distribución de la carga de coliformes totales (CT) de frutas y hortalizas analizados por ANOVA. Puntos dentro de las cajas, representan el 50% de las muestras. Línea azul media del parámetro $p=0.05$

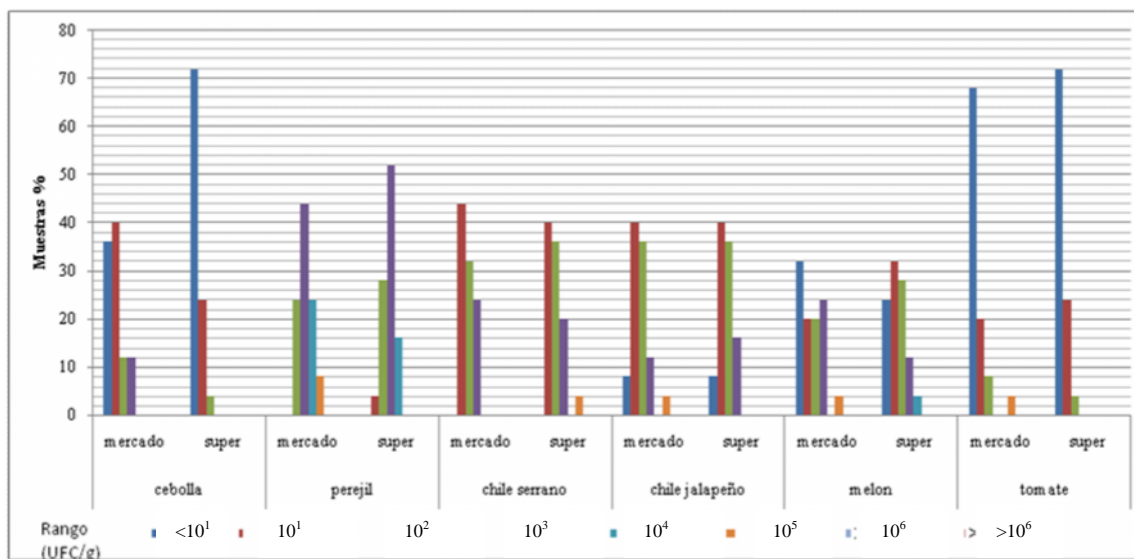


Gráfica 6. Distribución de la carga de coliformes totales (CT) analizados por ANOVA de frutas y hortalizas procedentes de supermercado o mercados populares.

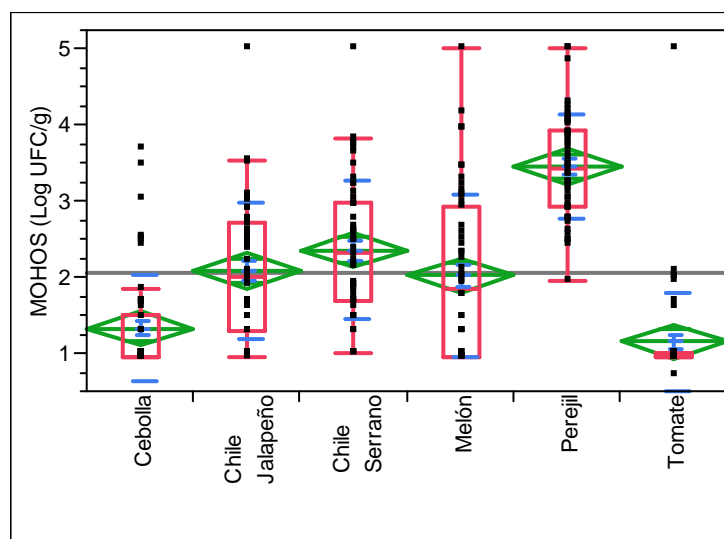
9.3 Mohos

Esta determinación se realizó siguiendo la metodología descrita en la NOM-111-SSA1-1994, y se presentaron valores de <10 a $>10^5$ UFC/g. Las muestras de perejil, presentaron las cuentas más altas para este parámetro, contrario a lo encontrado en la cebolla cambray y tomate donde en el 54 y 70% de las muestras respectivamente, se encontraron en <10 UFC/g (Gráfica 8). Según el análisis estadístico realizado, existe diferencia significativa entre los resultados de los vegetales analizados para este parámetro. No existió diferencia significativa en los orígenes de los sitios de muestreo ya sea supermercados o mercados populares establecidos (Gráfica 9). Sin embargo, la mayor parte de las muestras adquiridas en los mercados populares presentaron mayor contaminación que las de supermercados (Gráfica 7).

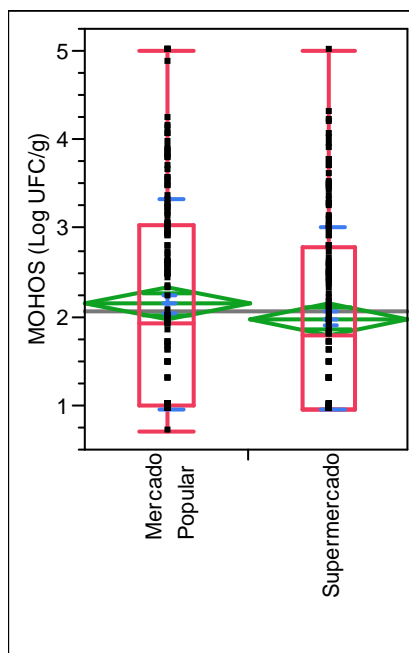
UFC/g	Número de muestras (%)					
RANGOS	Cebolla Cambray	Perejil	Chile Serrano	Chile Jalapeño	Melón	Tomate
<10	27(54)	0(0)	0(0)	4(8)	14(28)	35(70)
10^1	16(32)	1(2)	21(42)	20(40)	13(26)	11(22)
10^2	4(8)	13(26)	17(34)	18(36)	12(24)	3(6)
10^3	3(6)	24(48)	11(22)	7(14)	9(18)	0(0)
10^4	0(0)	10(20)	0(0)	0(0)	1(2)	0(0)
$>10^5$	0(0)	2(4)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)
Total	50	50	50	50	50	50



Gráfica 7. Número de muestras agrupadas en rangos dependiendo de las cuentas de mohos (M) obtenidas de supermercados y mercados populares, de acuerdo a la NOM-111-SSA 1-1994 para cada fruta y hortaliza analizada.



Gráfica 8. Distribución de la carga de mohos (M) de frutas y hortalizas analizados por ANOVA. Puntos dentro de las cajas, representan el 50% de las muestras. Línea azul media del parámetro.

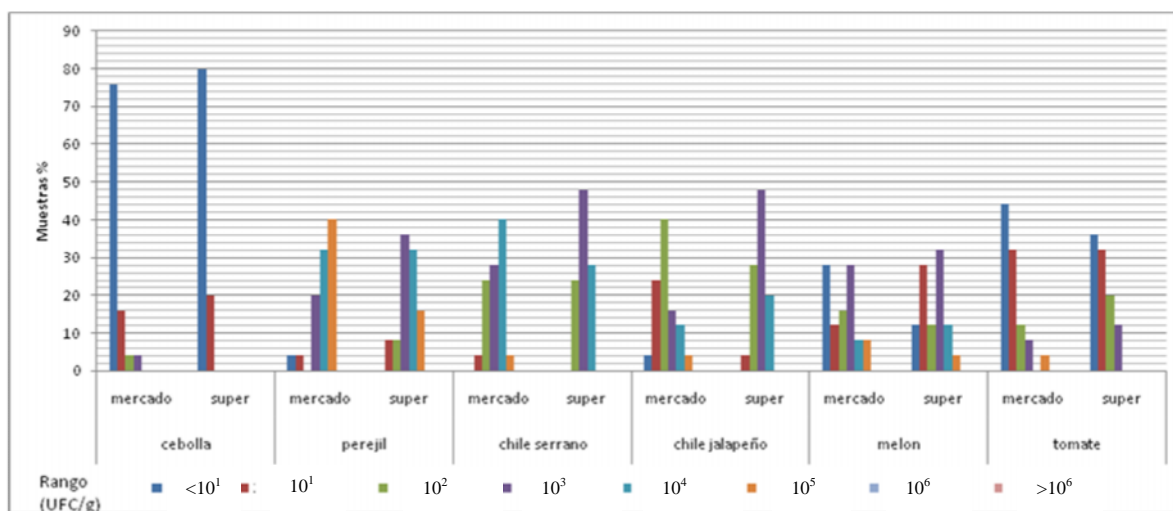


Gráfica 9. Distribución de la carga de mohos (M) analizados por ANOVA de frutas y hortalizas procedentes de supermercado o mercados populares.

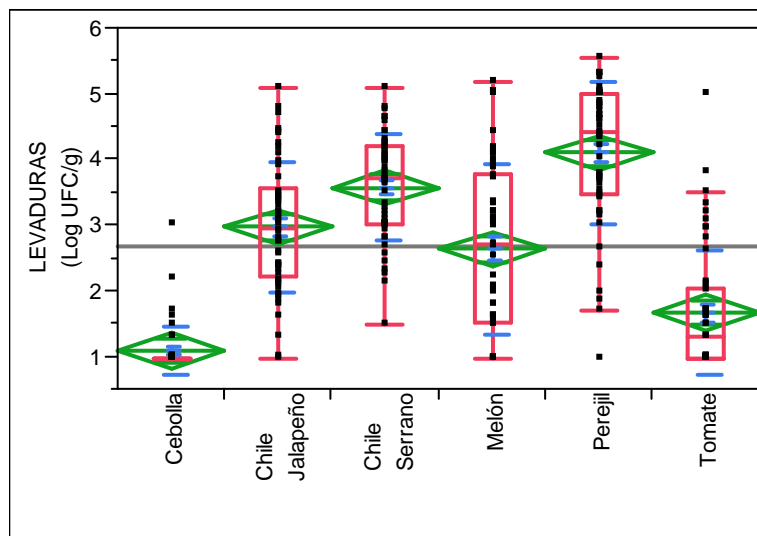
9.4 Levaduras

Las cuentas de levaduras presentes en las muestras fueron analizadas mediante el método descrito en la NOM-111-SSA1-1994 en las muestras analizadas estuvieron en rangos que fueron de <10 a $>10^5$ UFC/g, siendo el perejil el que mostró mayores cuentas (Gráfica 10). El 78% de las muestras de cebolla cambray y el 40% de las de tomate presentaron cuentas menores de 10^1 UFC/g. Según el análisis estadístico realizado, existe diferencia significativa entre los resultados de las frutas y hortalizas analizadas para este parámetro (Gráfica 11). Además no existió diferencia significativa entre el sitio de muestreo, (supermercados o mercados populares) (Gráfica 12). Observamos que las muestras de chile serrano adquiridas en supermercados presentaron cuentas bajas de levaduras (Gráfica 10).

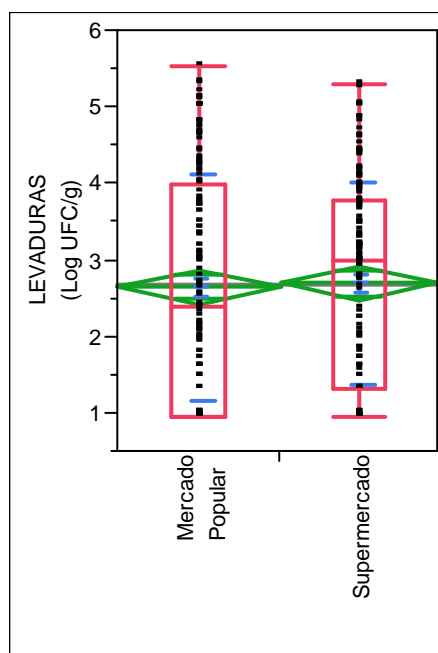
Log UFC/g	Número de muestras (%)					
RANGOS	Cebolla Cambray	Perejil	Chile Serrano	Chile Jalapeño	Melón	Tomate
<10	39(78)	1(2)	0(0)	1(2)	10(20)	20(40)
10 ¹	9(18)	3(6)	1(2)	7(14)	10(20)	16(32)
10 ²	1(2)	2(4)	12(24)	17(34)	7(14)	8(16)
10 ³	1(2)	14(28)	19(38)	16(32)	15(30)	5(10)
10 ⁴	0(0)	16(32)	17(34)	8(16)	5(10)	0(0)
>10 ⁵	0(0)	14(28)	1(2)	1(2)	3(6)	1(2)
Total	50	50	50	50	50	50



Gráfica 10. Número de muestras agrupadas en rangos dependiendo de las cuentas de levaduras (L), obtenidos de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994 para cada fruta y hortaliza analizada.



Gráfica 11. Distribución de la carga de levaduras (L) de frutas y hortalizas analizada por ANOVA. Puntos dentro de las cajas, representan el 50% de las muestras. Línea azul media del parámetro.



Gráfica 12. Distribución de la carga de levaduras (L) analizada por ANOVA de frutas y vegetales procedentes de supermercado o mercado.

9.5 Microorganismos patógenos

Todas las muestras recolectadas fueron analizadas para la presencia de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *E. coli* O157:H7.

9.5.1 *Salmonella* spp.

Para la detección de esta bacteria se utilizó el sistema inmunológico miniVIDAS® bioMérieux, teniendo de las 300 muestras analizadas, un resultado positivo, en una muestra de perejil (0.33%). Esta muestra provenía del municipio de Monterrey identificada como P30 (Figura 4). Dicho microorganismo fue aislado en agares selectivos (XLD, SS y chomID *Salmonella*), y al mismo tiempo cuantificada, mediante la técnica de Número Más Probable (NMP), detectando niveles de <3 NMP/g de acuerdo a las tablas de la NOM-112-SSA1-1994.

Para su confirmación se utilizó la técnica de PCR, amplificando el gen *invA* (275pb) específico del género (Figura 5). Además, se realizaron pruebas bioquímicas convencionales [descarboxilación de la lisina (+), movilidad (+), indol (-), descarboxilación de la ornitina (+), producción ácido sulfhídrico (+), utilización del citrato (-), fermentación de glucosa (+), producción de ureasa (-)]. Los resultados de dichas pruebas las identificaron como *Salmonella* Typhi aislada del municipio de Monterrey.

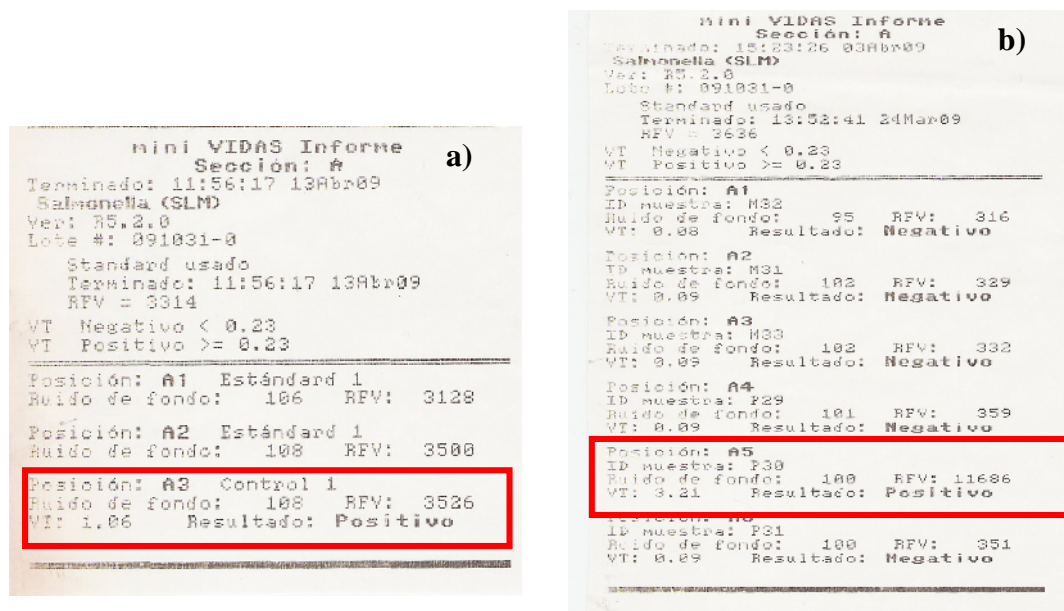


Figura 4. Comparación y resultado de la muestra positiva para *Salmonella* spp. según el sistema miniVIDAS® bioMérieux a). Resultados de control y estándares, b) Resultado de la muestra positiva de perejil para *Salmonella* spp (P30).

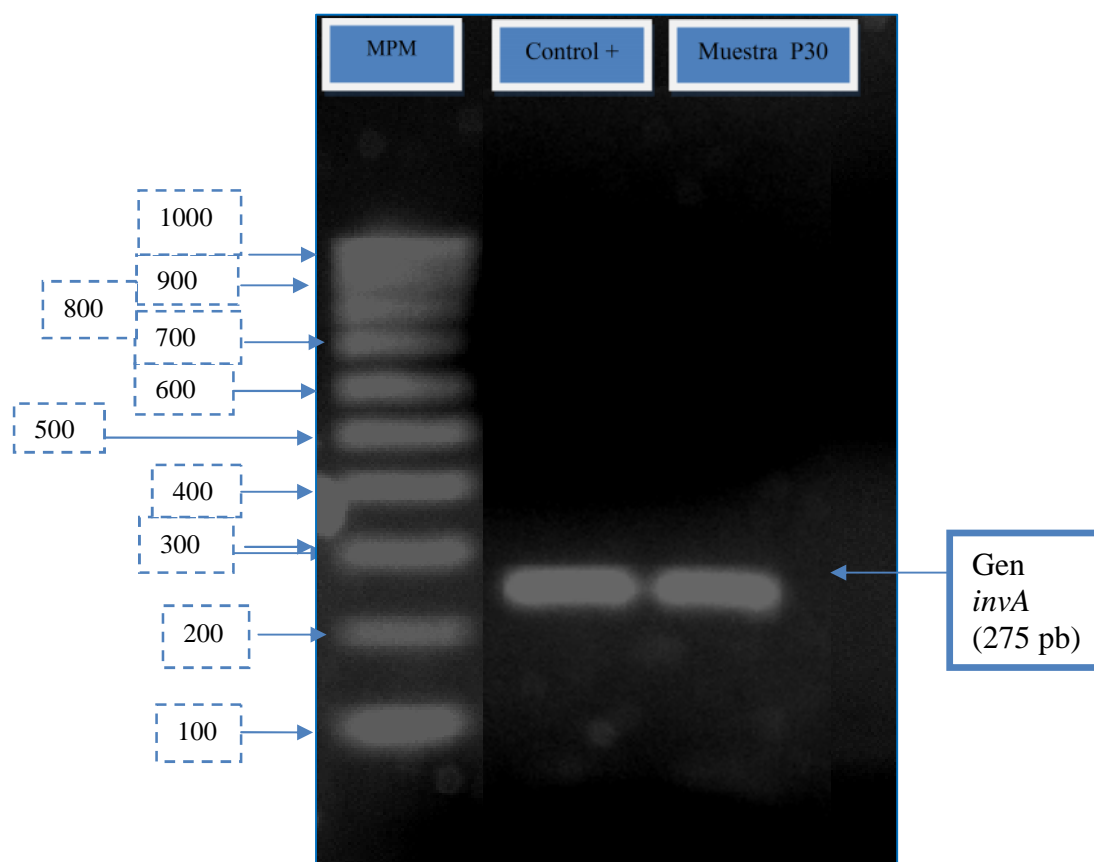
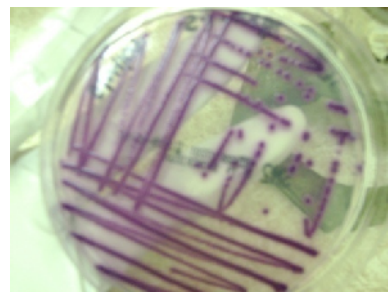


Figura 5. Productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen *invA* (275pb) para *Salmonella*. MPM: marcador de peso molecular, Control +: control positivo *Salmonella*

Typhimurium ATCC 14028, Muestra P30: muestra positiva *Salmonella* correspondiente a perejil.



XLD (colonias negras)



ChromID (colonias moradas)

Figura 6. Crecimiento y color de la colonia característico según el agar después de 24h a 37°C

9.5.2 *Shigella* spp.

Todas las muestras analizadas empleando la metodología que está reportada en el BAM cap. 6, fueron negativas para la presencia de *Shigella* spp.

9.5.3 *Campylobacter* spp.

Según el sistema miniVIDAS® se detectó una muestra positiva (0.33%) de perejil (identificada como P37) procedente del municipio de Escobedo, (Figura 7.0). Al ser aislada en el agar selectivo Campy-Cefex se realizaron pruebas bioquímicas convencionales indicadas en el BAM cap 7, que comparándolo con el comportamiento reportado [bacilos Gram negativos, oxidasa (+), catalasa (+), hipurato de sodio (-), resistencia al ácido Nalidíxico (30µg) (+), movilidad (+), TSI (-), nitratos (-), crecimiento a 42°C (+)]; probablemente se trate de *C. lari*. Además se realizó una identificación de especies según la técnica de PCR (metodología de Clark y Fratamico) donde se identifica ya sea *C. jejuni* y/o *C. coli*, siendo en nuestro caso negativa para ambas especies.

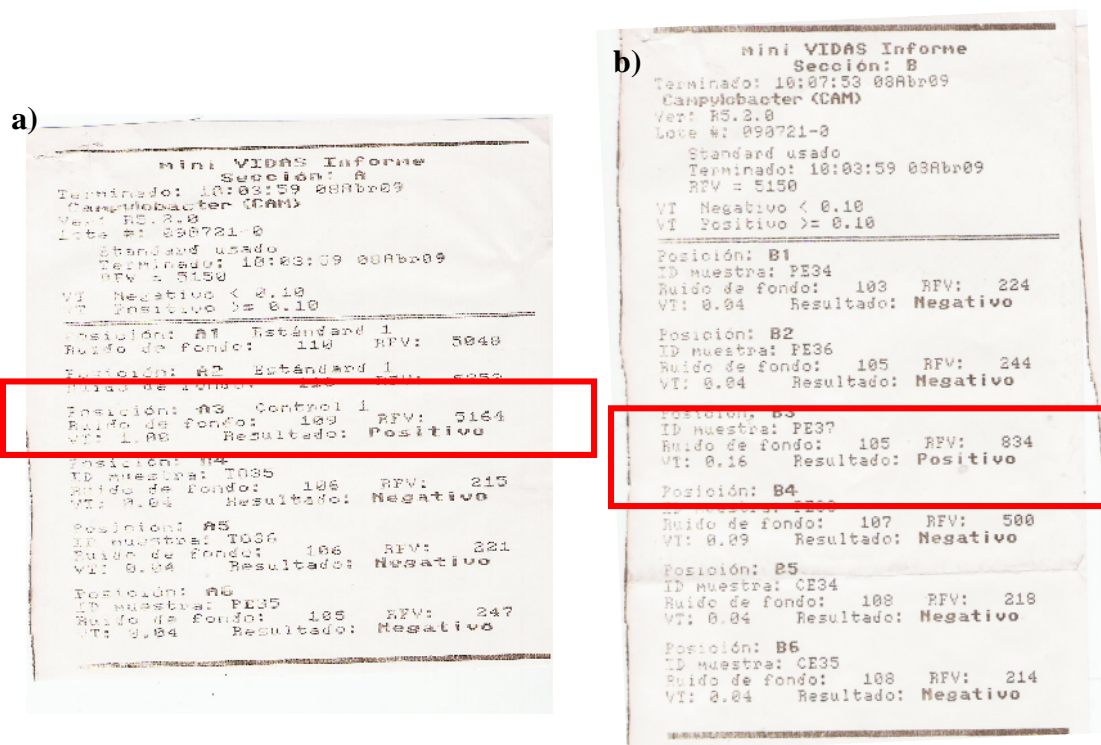


Figura 7. Comparación y resultado de la muestra positiva para *Campylobacter* spp. según el sistema miniVIDAS® a). Resultados de control y estándares, b) Resultado de la muestra positiva de perejil para *Campylobacter* spp. (P37).

9.5.4 *L. monocytogenes*

De las muestras analizadas para la búsqueda de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* por el sistema miniVIDAS® (Figura 8), sólo 3 (1%) fueron positivas para el género, sin embargo, al realizar el aislamiento en agares tanto selectivos como cromogénicos (OXA y OAA) y después de realizar pruebas bioquímicas, se identificó una cepa como *L. monocytogenes* (Tabla 3), la cual también fue confirmada por PCR (Figura 9).

Tabla 3. Identificación de las especies de *Listeria* positivas por el sistema miniVIDAS®

MUESTRA	<i>Listeria</i>
Perejil 13	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
Perejil 30	<i>L. ivannovi</i>
Perejil 46	<i>L. innocua</i>

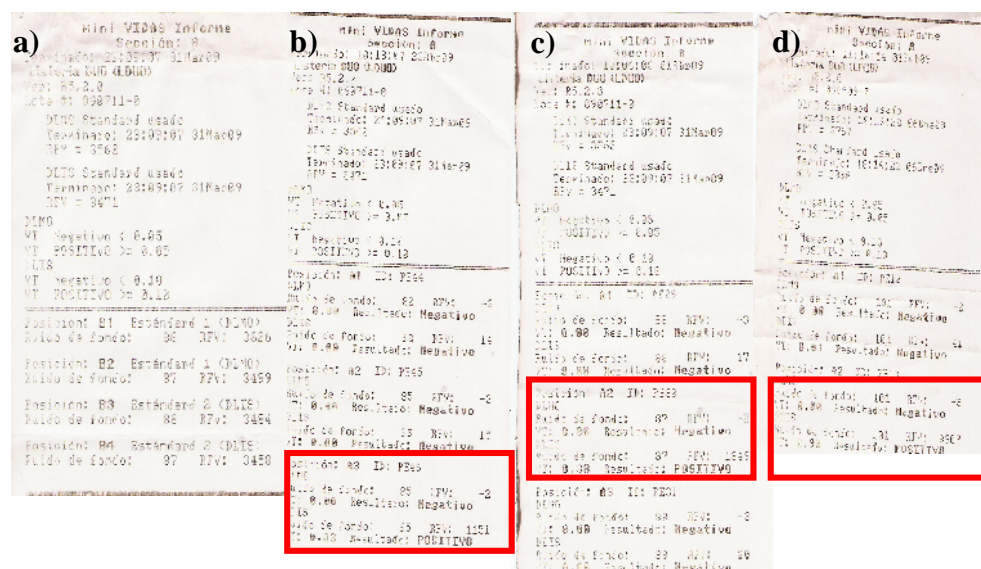


Figura 8. Comparación y resultado de las muestras positivas para *Listeria* spp. según el sistema miniVIDAS® a). Resultados de control y estándares, b-d) Resultado de la muestras positivas de perejil para *Listeria* spp. (P13, P30, P46).

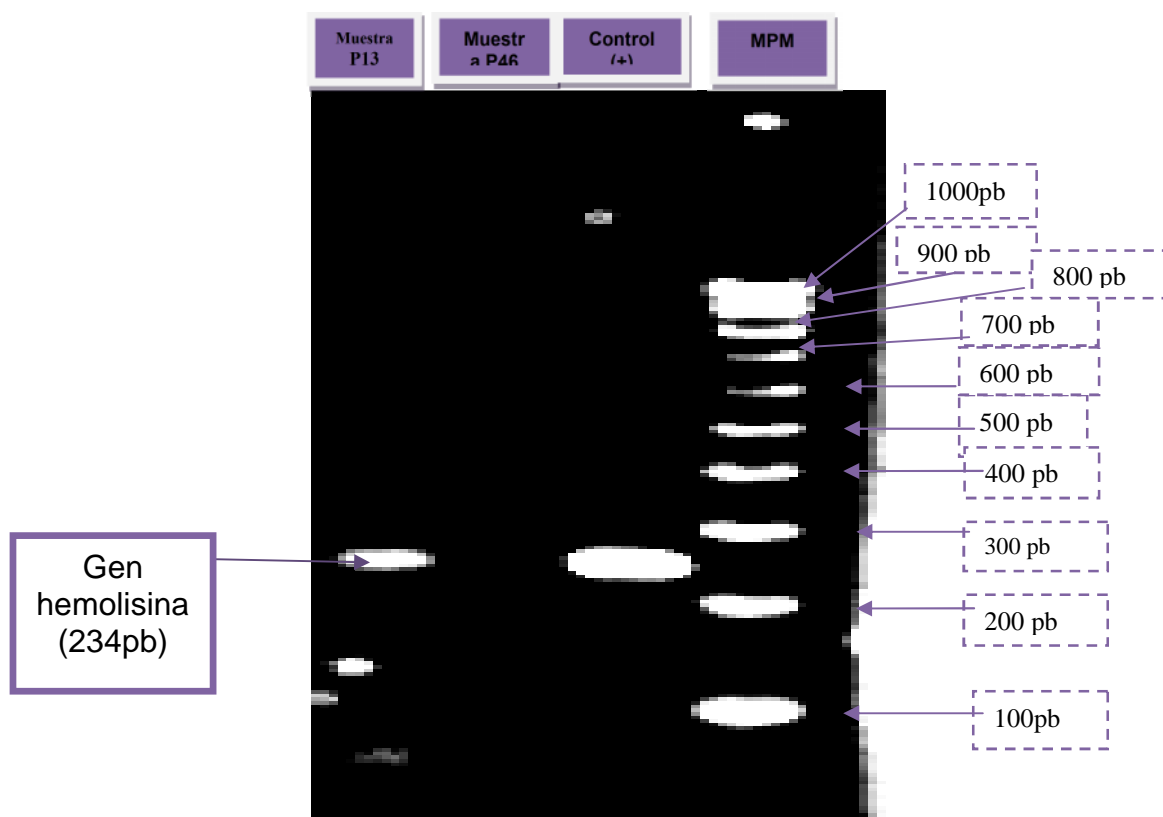


Figura 9. Productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen de la hemolisina (234pb). Muestra P13: aislado de *L. monocytogenes* proveniente de perejil (P13). Muestra P46: aislado de *Listeria* spp. proveniente de perejil (P46). Control (+): control positivo *L. monocytogenes* SCOTT A; MPM: marcador de peso molecular.

9.5.5 *Clostridium perfringens*

Se siguió la metodología reportada por el BAM cap 16, donde se logró aislar a *C. perfringens* sólo en 6 muestras de perejil (2% del total de las muestras). Al realizar la cuantificación de dicho microorganismos se obtuvieron cuentas desde 10 a 3×10^3 UFC/g (Tabla 4). Los aislados fueron identificados por pruebas bioquímicas y morfología [bacilos Gram positivos, fermentación de leche tormentosa (+) movilidad (-) nitratos (-) ácido sulfhídrico (+), coagulación de gelatina (+), lactosa (+)] así como por PCR. En esta última técnica se amplificó únicamente el gen que codifica para la α -toxina (*cpa*), y no el que codifica para la enterotoxina (*cpe*) lo que indica que el aislado corresponde a *C. perfringens* no enterotoxigénico (Figura 10).

Tabla 4. Cuentas de *C. perfringens* en muestras positivas de perejil

<i>Clostridium perfringens</i>	
MUESTRA	UFC/g
P1	10 UFC/g
P12	20 UFC/g
P27	70 UFC/g
P30	3000 UFC/g
P36	10 UFC/g
P50	10 UFC/g

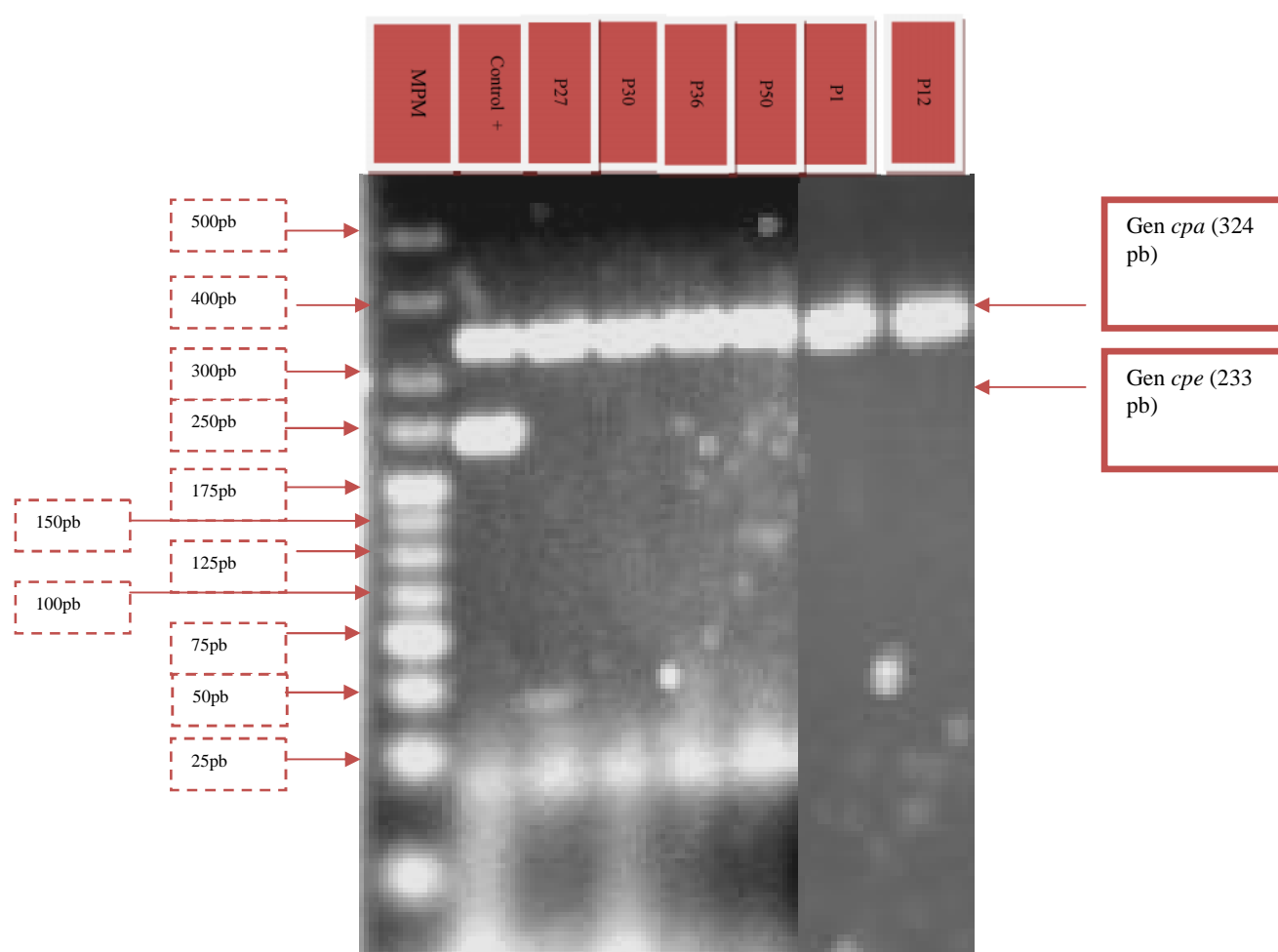


Figura 10. Productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen *cpa* (324 pb) y *cpe* (233pb). MPM: marcador de peso molecular. Control +: control positivo de *C. perfringens* FD-1041. Carril 3-8 muestras positivas de *C. perfringens* correspondientes a perezil (P27, P30, P36, P50, P1, P12).

9.5.6 *E. coli* O157:H7

De las muestras analizadas, se obtuvieron 22 positivas para la presencia de *E. coli* O157:H7 (8.6%), según el sistema miniVIDAS® (Tabla 7). Al ser confirmadas por pruebas bioquímicas convencionales, serología, PCR sencilla y multiplex, y todas fueron negativas para este serotipo.

Tabla 5. Resultados de muestras positivas para *E. coli* O157:H7

<i>Escherichia coli</i> O157:H7		
Muestra	<i>E. coli</i> O157:H7 por miniVIDAS®	<i>E. coli</i> O157:H7 por PCR
Perejil	15(30%)	0
Melón	2 (4%)	0
Chile Serrano	2(4%)	0
Cebolla Cambray	1(2%)	0
Tomate	2(4%)	0

Los resultados obtenidos de la presencia de patógenos en este estudio en los vegetales estudiados se resumen en la tabla 6:

Tabla 6. Muestras positivas de patógenos encontrados en las frutas y hortalizas analizadas.

MUESTRA	PATÓGENOS					
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Shigella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. perfringens</i>
cebolla cambray	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50
Perejil	0/50	1/50	0/50	1/50	1/50	6/50
chile serrano	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50
chile jalapeño	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50
Melón	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50
Tomate	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50

Por último, las muestras que fueron positivas para los patógenos aislados, fueron adquiridas en los municipios de Monterrey, San Nicolás de los Garza y Escobedo. No se aisló ningún patógeno en los municipios de San Pedro Garza y García y Guadalupe (Tabla 7).

Tabla 7. Prevalencia de patógenos encontrados por cada municipio muestreado

	Número de muestras positivas (%)						
Municipios	<i>E.coli</i> <i>O157:H7</i>	<i>Salmonella</i> spp	<i>Shigella</i> spp.	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Campylobacter</i> spp	<i>C. perfringens</i> no enterotoxigenico	<i>Listeria</i> spp.
Monterrey (60)	0	1(1.6%)	0	0	0	1(1.6%)	0
San Nicolás de Los Garza (60)	0	0	0	1(1.6%)	0	3(5%)	2(5%)
Escobedo (60)	0	0	0	0	1(1.6%)	2(3.3%)	0
Guadalupe (60)	0	0	0	0	0	0	0
San Pedro Garza García (60)	0	0	0	0	0	0	0

DISCUSIÓN

Hasta hace algunos años, a las frutas y hortalizas se les consideraba alimentos seguros para ser consumidos, ya que no presentaban algún riesgo para la salud. Sin embargo, en la actualidad, estos han sido vinculados a la transmisión de enfermedades gastrointestinales, y poco a poco, la comunidad científica ha puesto más atención en ellos.

En las últimas tres décadas, los reportes de enfermedades asociados al consumo de estos productos han incrementado, debido principalmente a los cambios en la alimentación de las personas, a la industria alimentaria que los ha incorporado con más frecuencia como materia prima, y a la globalización, que hace que este tipo de productos lleguen a lugares donde antes no se tenía acceso (Sivlipalasingam, *et al.*, 2004). Hasta el 2008, la CDC reportó 148 brotes atribuidos a productos vegetales de los cuales ocho se ha relacionado con productos mexicanos exportados hacia Estados Unidos.

Para nuestro país, existen algunos estudios que se han realizado para determinar la calidad microbiológica de estos productos, aunque son escasos; tal es el caso de la búsqueda de patógenos en el melón, chile, col, repollo, cilantro, perejil, brócoli, cebolla, lechuga, papa, berro y perejil, principalmente (Gallegos, *et al.*, 2008; Castillo, *et al.*, 2004; Johnston, *et al.*, 2006; Figueroa, *et al.* 2005; Quiroz, *et al.*, 2009; Castro, *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de ellos van dirigidos solo a la evaluación de solo un tipo de producto y la determinación de algunos patógenos fecales. En la presente investigación analizamos para el perejil, cebolla cambray, melón, tomate, chile jalapeño y serrano, un parámetro amplio de microorganismos que comprendía la cuenta total de microorganismos mesofílicos aerobios (CTV), coliformes totales (CT), mohos (M), levaduras (L) y la presencia de patógenos como *Salmonella* spp, *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens* y *E. coli* O157:H7.

Las Normas Mexicanas no manejan parámetros para productos como frutas y verduras, sin embargo la NOM-093-SSA1-1994 Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos establece parámetros para ensaladas preparadas crudas que incluyen este tipo de productos Cuenta total de mesofílicos aerobios 150 000 UFC/g, coliformes fecales 100 NMP/g. Según los resultados obtenidos en la presente investigación la cuentas de microorganismos indicadores fueron en muchas ocasiones altas alcanzando valores de hasta $>10^7$ UFC/g. Esto concuerda con un estudios como el realizado por Ailes, *et al.* (2008), quienes encontraron una alta concentración de microorganismos indicadores en los productos vegetales analizados (col, melón, apio, perejil espinaca, acelga, cilantro, perejil), presentándose cuentas de microorganismos mesofílicos aerobios en un rango de 4×10^4 a 7×10^6 UFC/g y coliformes totales de 1 a 4×10^3 UFC/g, teniendo que el perejil presentó cuentas más altas (1×10^6) para los microorganismos mesofílicos aerobios y 1×10^2 para coliformes totales. A su vez, los autores en ese mismo trabajo realizaron una comparación entre los productos almacenados en cajas para ser distribuidos y los que eran recolectados en el campo, y se concluyó que los primeros presentaban cuentas altas (aproximadamente 1 log) de microorganismos indicadores en comparación con los que se recolectaban en el campo (Ailes *et al.*, 2008).

Otros autores como Johnston, *et al.*, (2006) coinciden con estos resultados, al analizar acelga, nabo, col, repollo, cilantro, perejil, melón y brócoli de origen mexicano encontrando rangos de 6×10^5 a 8×10^7 UFC/g de microorganismo mesófilos aerobios y menos de 10 a 3×10^4 UFC/ g de coliformes totales. En el 2001, Hirotani, *et al.*, encontraron una concentración alta de microorganismos indicadores (coliformes totales, coliformes fecales, colifagos y estreptococos) en muestras de pimiento de origen mexicano comparados con los productos de origen estadounidense (Hirotani, *et al.*, 2001).

De la misma forma, en India, Saroj *et al.* (2006), encontraron que las cuentas de microorganismos mesofílicos aerobios estaban entre 6×10^7 a 9×10^8 UFC/g en germinados nativos de ese país. Los coliformes conformaron cerca del 90% de la flora encontrada, en un rango de 2.50×10^5 a 7.90×10^8 UFC/g; para los mohos y levaduras se encontró un rango de 4×10^3 a 2.0×10^7 UFC/g; la fuente principal de contaminación pudo ser el aire y el polvo (Saroj, *et al.*, 2006). Por su parte Viswanathan y Kaur (2001), reportaron cuentas de microorganismos mesofílicos aerobios en frutas y hortalizas en un rango de 10^6 a 10^8 UFC/g y 10^5 a 10^{10} UFC/g respectivamente, para coliformes totales los valores iban de 10^4 a 10^7 UCF/g y 10^6 a 10^9 UFC/g, además se realizó el aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de una muestra de germinado de alfalfa (Viswanathan and Kaur, 2001).

De las 300 muestras analizadas en nuestra investigación, según los análisis estadísticos realizados, existió diferencia significativa ($F > 0.05$) entre cada fruta y hortaliza analizada, para el caso de la cuenta de microorganismos indicadores (microorganismos mesofílicos aerobios, coliformes totales, mohos y levaduras). Encontramos concentraciones elevadas ($>10^6$ UFC/g) para el perejil y la cebolla cambray, mientras que para el chile jalapeño y serrano al igual que el melón, los rangos fueron menores a 10^5 UFC/g. El tomate fue la muestra que presentó cuentas menores de 10^4 UFC/g. Esto podría deberse a que se ha reportado que la cantidad de microorganismos indicadores depende de las características físicas ya sea de la fruta u hortaliza, las condiciones de cultivo de cada una, el manejo post-cosecha que éste tenga, y las condiciones en las que se encuentren almacenadas (Bechat and Ryu, 1997; Scott, *et al.*, 2005; Bowen A., *et al.*, 2006). Padga *et al.* (2000) demostraron que la cantidad de microorganismos presentes en el brócoli depende de la estructura física que tenga este, permitiendo un establecimiento de los microorganismos en diferentes partes del producto. Es decir, no se presentará la misma concentración de microorganismos en vegetales que tengan una superficie lisa, que en los que tengan una corteza rugosa, e inclusive los que tienen hojas. Esta puede ser una razón importante de las diferencias encontradas entre los vegetales analizados.

Con respecto al sitio de muestreo, (supermercado o mercado), esperábamos que las muestras de mercados populares estuvieran más contaminadas que las de los supermercados, ya que estas últimas, se encuentran en condiciones de almacenaje más controladas, sin embargo según el análisis estadístico realizado, no hubo diferencias significativas de cada parámetro con respecto al sitio de muestreo. Contrario a esto, Miranda *et al.* (2008) obtuvieron, según sus estudios con vegetales, que la mayor contaminación fue en muestras de mercado en comparación con los obtenidos de supermercados.

Al realizar un análisis de correlación entre las muestras para CTV y CT, encontramos una correlación positiva entre ambos parámetros, es decir cuando un parámetro está presente en concentraciones elevadas, el otro se comporta de la misma manera. Caso contrario a lo observado en los mohos y levaduras en donde no existió correlación con los demás parámetros. Con esto podemos suponer que, si no se siguen las condiciones ideales de almacenamiento y manejo post-cosecha para cada producto, pudiera contribuir a que estos microorganismos se diseminen y estén presentes en el producto, debido a su ubicuidad ya que la dispersión puede ser por aire y agua, además, su fisiología les permite tolerar condiciones ambientales desfavorables (Leclerc, *et al.*, 2001).

Las cuentas altas de microorganismos indicadores obtenidas en este estudio, pudieran deberse al procesamiento y manipulación que tienen las frutas y hortalizas desde el campo hasta el consumidor (Johnston, *et al.*, 2006). Se ha reportado que existe un alto riesgo que los productos vegetales sean contaminados durante su manejo y almacenamiento (Ailes, *et al.*, 2008). Inclusive, el almacenaje prolongado de las frutas y hortalizas cortadas, puede contribuir a que se incremente la carga de microorganismos presentes en estos productos (Odumeru, *et al.*, 1997). Si se sabe de antemano que estos productos traen una carga de microorganismos inicial como flora acompañante, es

probable que junto con las malas condiciones de almacenaje (abuso de temperatura, humedad entre otras), esto pudiera favorecer su proliferación en los productos vegetales.

Generalmente, cuentas altas de microorganismos indicadores se relacionan con una vida de anaquel corta y por lo tanto baja calidad. Aunque, la significancia de niveles altos de CTV y CT en los productos no está bien definida, ya que se ha mencionado que estas poblaciones microbiológicas no son necesariamente indicadores relevantes de seguridad alimentaria (Johnston, *et al.*, 2005). Por lo que se puede decir que nuestros productos al tener cuentas elevadas de microorganismos indicadores, no necesariamente significa, que sea de mala calidad, sino, que se puede estar acortando la vida de anaquel y quizá, afectando sus propiedades organolépticas. Se sabe que aproximadamente un 30% de producto es pérdida debido a los microorganismos deteriorantes que se presentan en el productos desde el almacenamiento hasta el consumo del mismo (Beuchat, 1992). Sin embargo, altas concentraciones de microorganismos indicadores pudieran aumentar el riesgo de ETAs,

Patógenos

En esta investigación se evaluó también la presencia de microorganismos patógenos, encontrando en forma general una baja incidencia en la detección de los mismos. La baja prevalencia de microorganismos patógenos coincide con otros estudios publicados, en otras partes del mundo donde por ejemplo, en EUA, la FDA (2000) en sus estudios realizados a productos importados encontró que de 1028 muestras evaluadas (melón estilo cantaloupe, apio, cilantro, lechuga, perejil, cebolla cambray, fresas y tomates), el 99% de estas, estuvieron libres de *Shigella*, *Salmonella*, y *E. coli* O157. Así mismo, en el 1999 se evaluaron 1000 muestras de vegetales (brócoli, melón estilo cantaloupe, apio, cilantro, lechuga, perejil cebolla cambray, fresas y tomates) de las cuales el 96% estuvieron libres de patógenos, solo 44 (4%) muestras fueron contaminadas con *Salmonella* y *Shigella*, con un 80 y 20% respectivamente (Johnston, *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Bohaychuk, *et al.*, (2009), no detectaron microorganismos patógenos en los productos vegetales analizados (lechuga, espinacas, tomates, zanahoria, cebolla cambray y fresas) en Ontario, Canadá. En el mismo sitio de Canadá, se analizaron frutas y hortalizas (lechuga, melón (*Cucumis melo*), cebollín, cebolla cambray, perejil, cilantro y tomate frescos) recolectados en centros de distribución y mercados, en el verano del 2004, encontrándose 0.17% de las muestras fueron positivas para *Salmonella* spp., sin embargo no se detecta *E. coli* verotoxigénica en ninguna de ellas (Arthur, *et al.*, 2007).

Sagoo, *et al.* (2003) en Reino Unido, aislaron a *Listeria* spp. en el 4% de las muestras analizadas de ensaladas listas para consumo conteniendo vegetales como lechuga, tomate, pepino, zanahoria rallada, pimiento, berro, col, germinados entre otros (125 de 2944) y *L. monocytogenes* en un 3% (88 de 2934). En ese caso, ni *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. ni *E.coli* O157 se detectaron en las muestras examinadas (Sagoo, *et al.*, 2003).

Algunos autores han señalado que la fecha de muestreo es importante para determinar la cantidad y presencia de microorganismos patógenos. En invierno es menos probable encontrar patógenos en comparación con épocas más calurosas, quizá, fue por ello que en nuestros resultados se encontraron baja cantidad de patógenos ya que las muestras fueron colectadas en meses fríos (enero a abril) (Akins, *et al.*, 2008).

Se conoce poco sobre la interacción de microorganismos patógenos con microorganismos deterioradores de los productos. Dicha interacción es principalmente antagonica ocurriendo sólo en el caso de las bacterias ácido lácticas que han sido las más estudiadas y son componentes principales de la flora nativa de frutas y hortalizas. Esta interacción puede ser debida entre otras cosas a: la disminución del pH, generación de peróxido de hidrógeno, competencia por nutrientes y producción de compuestos antimicrobianos, tales como bacteriocinas o antibióticos (Francis, *et al.*, 1999). Con lo anterior, en nuestro estudio nuestro estudio obtuvimos cuentas elevadas de

microorganismos indicadores, lo que probablemente puede ser un factor importante para no tener alta incidencia de patógenos.

***Salmonella* spp.**

Para el caso de la búsqueda de *Salmonella* spp. por el sistema miniVIDAS® bioMérieux, fue detectada esta bacteria solo en una muestra correspondiente a perejil adquirida en el municipio de Monterrey. En este sentido, el porcentaje de incidencia de *Salmonella* fue del 0.3%.

Frutas y hortalizas frescas han sido identificadas como vehículo para la infección con *Salmonella* spp. (Izumi, *et al.*, 2008). Además, este microorganismo ha sido ligado a brotes masivos por el consumo de estos productos y en específico de melón y chiles jalapeño y serrano (Wells and Butterfield, 1999; Tauxe *et al.* 1997).

Múltiples estudios han demostrado el aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de productos frescos y la prevalencia de esta bacteria en vegetales puede ser tan alta como 8%. Mukherjee *et al.* en el 2004, evaluaron frutas y hortalizas orgánicas entre las que incluían tomates, espinacas, col, acelga, lechuga, pimientos verdes, pepino, brócoli, fresas, manzana, calabaza, melón, entre otros, obteniendo un 0.4% de prevalencia de *Salmonella* spp. cuyo microorganismo se aisló en una muestra de lechuga orgánica y de pimienta verde (Mukherjee, *et al.*, 2004).

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Castillo *et al.* (2004), donde obtuvieron una baja prevalencia de *Salmonella* spp. en melones cultivados en Texas, E.U.A. (0.5%), y del 0.3% encontrado en melones cultivados en Colima, México (Castillo, *et al.*, 2004). Así mismo, se obtuvo una prevalencia del 0.7% de este microorganismo en ocho muestras de melón y 0.3% en lechuga (Izumi, *et al.*, 2008). En Japón, Konishi, *et al.*, (2001), reportaron prevalencias bajas de *Salmonella* spp., de

0.7% (3 de 398 muestras) para melones y 0.3% (1 de 299) en germinados de alfalfa (Konishi, *et al.*, 2001).

El año pasado Gallegos, *et al.*, reportaron la presencia de *Salmonella* spp. en 12 (43%) muestras de melón y en 10 (37%) muestras de chile de México. Veinte de los 22 aislados se identificaron con el serovar Typhimurium, en tanto que las dos restantes fueron Enteritidis (Gallegos, *et al.* 2008).

El reporte más reciente en México sobre la incidencia de este patógeno fue realizado por Miranda *et al.*, en el presente año, donde después de evaluar 116 muestras de las cuales 78 eran vegetales como lechuga, espinacas, zanahoria, cebolla, tomate y chile, se logró aislar a *Salmonella* spp. en 4 muestras adquiridas en supermercados y 13 de mercados populares, obteniendo un 21.8% de incidencia total de este microorganismo (Miranda, *et al.*, 2009).

Quiroz *et al.* (2009) en nuestro país encontraron una incidencia de 5.7% de *Salmonella* spp. evaluando vegetales tales como apio, brócoli, cebolla, cilantro, coliflor, lechuga, papa, berro, perejil entre otros; de ellos 12% fueron del perejil, presentándose como principal cepa aislada *Salmonella* serovar Typhimurium, y *Salmonella* Typhi fue aislada de una muestra de perejil (Quiroz, *et al.* 2009).

En el caso de nuestro estudio la cepa aislada de *Salmonella* proveniente de perejil se identificó por pruebas bioquímicas convencionales teniendo el mismo patrón que *Salmonella* Typhi. Se tienen reportes donde *Salmonella* Typhimurium es capaz de contaminar las partes de comestibles de plantas de perejil a través del agua de irrigación, formando agregados en la superficie de las hojas (Lapidot and Yaron, 2009).

Salmonella serovar Poona ha sido la especie predominante en diversos brotes encontrándose principalmente en melones (Richards and Beuchat, 2004). Ukuku y Fett (2001), demostraron que *Salmonella* Stanley inoculada en la superficie de los melones es

capaz de transferirse a los tejidos internos cuando la fruta es cortada y preparada para su consumo (Ukuku and Fett, 2001). A pesar de que nuestra cepa aislada no fue procedente de melones, algunos estudios presentan evidencia sobre la formación de biopelículas por patógenos para humanos en tejidos de plantas, los cuales resisten tratamientos con desinfectantes o biocidas. Lapidot, *et al.* (2006) demostraron que *Salmonella* serovar Typhimurium es capaz de sobrevivir en plantas como el perejil, después de un tratamiento con cloro, concluyendo que los mecanismos por los cuales sobrevive y encuentra la protección suficiente es mediante la penetración a los tejidos de la planta, a la producción de una biopelícula preexistente y/o a la producción de polisacáridos como la celulosa (Lapidot, *et al.*, 2009).

Shigella spp.

En nuestro estudio no se detectó la presencia de *Shigella* spp. en ninguna de las muestras analizadas. Algunos estudios reportado una baja incidencia de *Shigella* spp. en vegetales (Cetikaya, *et al.*, 2008; Alcoba, *et al.*, 2005; Tambekar and Mudhada, 2006; Lunsford P, 1997). Este microorganismo se ha aislado de productos como ensaladas de papa, en dips de frijol, y en algunos vegetales crudos como lechuga, perejil y tomate, entre otros (Warren BJ, *et al.*, 2007). Sin embargo, la incidencia de ETAs causadas por especies de *Shigella*, es mucho menor a la que se reporta para otros patógenos entéricos como *Salmonella*, que cada año se encuentran un gran número de éstos debido al consumo de productos frescos contaminados como las frutas y hortalizas (Bagamboula, *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que esta bacteria es sensible a los cambios en las condiciones de crecimiento de la bacteria. Warren *et al.* (2006) demostraron que las superficies de los tomates no permiten la sobrevivencia de *S. sonnei* cuando se almacenaron a una temperatura de 13°C y 85% de humedad relativa (Warren BJ, *et al.*, 2006).

Campylobacter

En nuestro estudio se aisló en una muestra (0.33%) de perejil contaminada con *Campylobacter lari*, proveniente de un mercado popular del municipio de Escobedo. Esto concuerda con lo reportado por Park y Sanders en 1991, donde analizaron la ocurrencia de especies termotolerantes de *Campylobacter* en 1546 muestras de 10 tipos diferentes de vegetales (entre ellos espinaca, lechuga, rábano, cebolla cambray, perejil, papa, apio, zanahoria, col y pepino) de los cuales 533, fueron provenientes de mercados populares y 1031 de supermercados. Los autores detectaron a *C. lari* en una muestra de perejil (1/42), proveniente de un mercado. Sin embargo, en un estudio realizado en Malasia, fueron evaluadas 309 muestras entre las que se encontraban espinacas, ejotes (*Vigna unguiculata*), espárragos (*Psophocarpus tetragonolobus*), germinado de soya (*Vigna radiata*), cilantro vietnamita (*Poligonum minus*), perejil japonés (*Oenanthe stolonifera*) y dos especies de flores comestibles de la región (*Centella asiatica* y *Cosmos caudatus*) de 2 supermercados y un mercado popular de ese país, en donde se encontró una incidencia de 51.9% de *Campylobacter* spp., 40.7% *C. jejuni*, y 35.2% *C. coli* en el supermercado I de las muestras de germinado de soya, de espárragos, de perejil japonés y *Centella asiatica*; y para el supermercado II, encontraron *Campylobacter* spp. en un 67.7%, *C. jejuni* en el 67.7% y *C. coli* en el 65.7%, de las muestras de germinado de soya, espinaca, espárrago, perejil japonés, *Centella asiatica* y *Cosmos caudatus*; en tanto que para el mercado popular *Campylobacter* spp 29.4%, *C. jejuni* 25.5% y *C.coli* 22.6% de germinado de soya y de la especie *Centella asiatica*. Esta incidencia presentada es una de las más altas reportadas hasta el momento para el caso de estos productos (Ching, *et al.*, 2007).

Se ha puesto en evidencia que este microorganismo normalmente no es aislado a partir de muestras de vegetales debido a que no existen las condiciones adecuadas para el desarrollo de este patógeno en estos productos. Además que se ha visto que este microorganismo se encuentra en muy baja cantidad en la mayoría de los alimentos (Kumar, *et al.* 2001), aunado a que se sabe que *Campylobacter* puede entrar en su estado viable no cultivable (Buswell *et al.* 1998) así como a su estacionalidad que presenta

aislándose mayormente en época de calor en comparación con frío (Stanley and Jones, 2003).

Las probables fuentes de contaminación de los vegetales por *Campylobacter* incluyen, agua contaminada utilizada para el riego y lavado, suelo y materia orgánica asociada a lodos activos, materia fecal de animales y/o humanos y personas infectadas que manipulan los productos durante y después de la cosecha. Se sabe que el agua no tratada utilizada en el área de cultivo, puede estar altamente contaminada con especies termotolerantes de *Campylobacter*, estas bacterias fueron aisladas en un 25 a 55% de pozos de agua en Washington y 43% en Inglaterra (Park and Sanders, 1992). En nuestro estudio, suponemos que la presencia de *Campylobacter* una muestra de perejil pudiera ser debido a contaminación cruzada, ya sea como materia fecal o agua contaminada.

Listeria* spp. y *L. monocytogenes

En este estudio realizamos la búsqueda de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* obteniéndose mediante el equipo automatizado miniVIDAS® bioMérieux a través del sistema LDUO. Encontramos 4 muestras contaminadas con *Listeria* (1.33%) (una con *L. monocytogenes*, 2 con *L. innocua* y una con *L. ivvanovi*) todas ellas en muestras de perejil. Previamente, Dreux *et al.*, (2007), reportaron la capacidad de *L. innocua* y *L. monocytogenes* de sobrevivir en el perejil. En general podemos considerar esta incidencia como baja semejante a lo reportado en otros trabajos. Por ejemplo, utilizando la tecnología BAX, encontraron a *L. monocytogenes* en una muestra de espinacas de 181 muestras analizadas (0.6%). A su vez, se detectó *L. innocua* en una muestra de berro (Fröder, *et al.*, 2007).

En Portugal, Guerra *et al.* (2001), evaluaron la presencia de *Listeria* en 429 muestras de alimentos sin procesar, de las cuales 138 correspondían a alimentos listos para el consumo (68 muestras de queso tradicional de ese país, 23 muestras de ensaladas y 47 muestras de carne) y 291 alimentos crudos (14 muestras de vegetales, 65 muestras de

pollo, 212 muestras de leche de vaca, oveja y cabra); encontrándose a *L. innocua* en 12 muestras (3%). Un año después, se encontraron tres muestras (lechuga, fresas y champiñones), positivas para *L. monocytogenes* cuando analizaron muestras de vegetales (Jonannesen, *et al.*, 2002). Aguado *et al.* (2004), reportaron una baja incidencia de *L. monocytogenes* a partir de vegetales congelados, sin embargo aislaron cepas de *L. innocua* colonizadoras de superficies y maquinaria dentro de la planta de procesamiento y en vegetales, concluyendo que la contaminación de estos productos se da principalmente por contaminación cruzada, por lo que se están dando condiciones de concluyendo de riesgo para contaminación por especies patógenas (Aguado, *et al.*, 2004).

Se ha reportando que la detección de *L. monocytogenes* en alimentos pudiera ser un tanto difícil ya que esta bacteria comúnmente está presente en muy bajas cantidades en comparación con la flora nativa. Las especies de *Listeria* más frecuentemente aisladas de alimentos son *L. innocua* y *L. monocytogenes*, incluso algunos estudios han demostrado que *L. innocua* ha sido aislada mayormente que *L. monocytogenes* (McDoonald and Sutherland, 1994; Lui, 2008). Oravcová *et al.*, 2008 obtuvieron falsos negativos cuando cultivaron a *L. monocytogenes* en concentración de 1 UFC en presencia de 10 UFC de *L. innocua*, además, observaron que *L. monocytogenes* fue prácticamente imposible detectar en agar cromogénico, concluyendo que *L. innocua* enmascaró el crecimiento de *L. monocytogenes* (Oravcová, *et al.*, 2008).

Nosotros logramos aislar 2 cepas de *L. innocua* y una de *L. monocytogenes* lo cual concuerda con lo reportado previamente, sin embargo, encontramos que por el sistema miniVIDAS® solo se detectó *Listeria* spp. y no *L. monocytogenes*. Sin embargo, 3 muestras, al hacer la confirmación en medio cromogénico se logró detectar la presencia de *L. monocytogenes*, aun cuando sólo se observó una sola colonia característica de esta especie.

Se sabe que el tiempo de generación de otras especies relacionadas a *L. monocytogenes* es generalmente más corto en medios de enriquecimiento, originando con ello una detección de falsos negativos para este patógeno. *L. innocua* presenta una ventaja sobre las demás especies de este género, ya que posee un mejor crecimiento en medios de cultivo selectivos al igual que es capaz de producir componentes inhibitorios para otras cepas (Oravcová, *et al.*, 2008). Liu *et al.*, (2008) reportaron a *L. innocua* como probable indicador de presencia de *L. monocytogenes* durante la producción de queso (Luis, *et al.*, 2008).

Como posible fuente de contaminación del perejil por *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* con este patógeno. Girardin, *et al.*, (2005) consideraron que la causa de transferencia de *L. innocua* del suelo a las hojas del perejil fue las salpicaduras que ocurren cuando se irriga el campo de cultivo o durante la lluvia (Girardin H, *et al.*, 2005). Con lo que se pudiera inferir que la principal fuente de contaminación de estos productos, sigue siendo la contaminación cruzada.

Clostridium perfringens

Para el caso de este microorganismo en el presente trabajo obtuvimos una incidencia del 2% en muestras de perejil. En 1999, Miwa, *et al.* encontraron a *C. perfringens* como el causante de una intoxicación en Japón, a consecuencia del consumo de un alimento preparado que contenía espinacas, entre otros ingredientes (Miwa, *et al.*, 1999). En años recientes, en un estudio realizado en Gales, se evaluó la calidad microbiológica de los alimentos listos para consumo, los cuales incluían frutas y hortalizas, donde no encontraron presencia de *C. perfringens* en ninguna de las muestras (Meldrum, *et al.*, 2009).

Existen algunos reportes de baja incidencia de esta bacteria como el reportado por Nguz *et al* (2004), en Zambia en donde no se detectó al microorganismo en ninguna de las muestras analizadas de mezcla de vegetales frescos listos para consumo y ejotes. Al

realizar la cuantificación de este microorganismo se han reportado bajos niveles de contaminación, tal es el caso de Nemati *et al.*, (2008), quienes reportaron en alimentos originarios de Irán cuentas de *C. perfringens* de 3.36 UFC/g.

La mayor parte de los estudios en la búsqueda de *C. perfringens* va dirigida a productos del mar, como ostiones, pescado, etc., así como productos cárnicos. Tal es el caso de lo reportado por Rahmati y Labbe (2008), donde de 347 muestras de productos del mar frescos y procesados adquiridos en puntos de venta, encontraron 17 muestras con *C. perfringens* y además todas presentaban el gen que codifica enterotoxina (*cpe*). Kamber *et al.*, (2007) reportaron la presencia de *Clostridium* spp en 31 de sus muestras evaluadas de carne molida, encontrando que 17 de estas pertenecían a la especie de *C. perfringens*, de los cuales solo el 13 % fueron positivas para el gen de la enterotoxina (Kamber U, *et al.*, 2007). A su vez, existe poca evidencia del aislamiento de *C. perfringens* a partir de las frutas y hortalizas, y muy pocos estudios van enfocados al estudio de esta bacteria como vehículos en productos frescos (Rahmati and Labbe, 2008).

En nuestro estudio se aislaron seis cepas de *C. perfringens* que al ser identificado por PCR no poseía el gen para la enterotoxina a partir de muestras de perejil, reafirmando con ello que esta bacteria puede estar presente en cualquier lugar, en especial en el suelo, sabiendo de antemano la larga cadena de producción que tiene el perejil, existe el riesgo que este en contacto con el suelo, y además sí no se le da el tratamiento adecuado como el lavado y desinfección, este producto puede convertirse en un nicho ideal para la proliferación de microorganismos patógenos. No hay demasiada evidencia de estudios microbiológicos en frutas y hortalizas acerca de la búsqueda de esta bacteria. Aunque nuestras cepas aisladas no presentaron el gen de la enterotoxina, que es el principal factor de virulencia que causa la intoxicación alimentaria, sí nos ofrece información sobre la existencia y supervivencia de microorganismos anaerobios presentes en estos productos, y en base a esto, nuestros resultados pueden contribuir como una base para

que se siga la búsqueda de estos microorganismos en productos como las frutas y hortalizas.

Ya que este microorganismo está presente en el suelo, al igual que otros esporulados como *Bacillus cereus* (Drobniewski, 1993; McKiillip, 2000; Shoeni and Wong, 2005), *C. perfringens* sobrevive por largos periodos, resiste la inactivación modificando temperatura y humedad relativa (Stine, *et al.*, 2005; Li, *et al.*, 2007). Brinton, *et al.*, 2009 encontraron en compostas de materia orgánica que se aplican en los campos de cultivo como fertilizantes, que el 70% de las muestras fueron positivas para *C. perfringens*, donde solo el 20% de estas presentó niveles >1000 UFC/g (Brinton, *et al.*, 2009).

A su vez Del Mar Gamboa *et al.*, (2005), reportaron la gran diversidad de especies de *Clostridium* en suelos de Costa Rica, encontrando a *C. sordelli* en un 42% y *C. perfringens* en 38% de las muestras analizadas. Esto sugiere que la fuente de contaminación con esta bacteria pudo haber sido a partir del suelo.

Algunos estudios han comprobado que *C. perfringens* tiene la capacidad para sobrevivir por largos periodos sobre la superficie de productos frescos como las frutas y hortalizas. Stine *et al.*, (2005), sugieren aceptar a esta bacteria como indicador de contaminación bacteriana y sobrevivir a varios ambientes en diferentes tipos de cultivos. Esto también fue comprobado por Hirotani *et al.*, (2001), que consideraron a las esporas de *C. perfringens* como un indicador de presencia de contaminación fecal o como indicador de la existencia de contaminación previa. Debido a que es un componente principal de la flora en el intestino, se comprobó que estaba presente en estas en un rango de 10^{10} UFC/g, por ello se puede considerar como un microorganismo indicador, ya que se encuentra en mayor concentración que los microorganismos aerobios (Leclerc, *et al.*, 2001).

***E. coli* O157:H7**

Las frutas y hortalizas han sido previamente ligados como vehículo para la infección con *E. coli* O157:H7 (Beuchat, 1996, De Waal *et al.* 2007; National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 1999). Sin embargo, existen algunos trabajos realizados en E.U.A. y la Unión Europea donde no se ha detectado *E. coli* O157:H7 en muestras de vegetales (Johnston *et al.* 2005; Mukherjee *et al.*, 2004; Mukherjee A, *et al* 2006; Riordan, *et al.*, 2001; McMahon and Wilson, 2001; Sagoo, *et al.*, 2001).

El hecho que en nuestro trabajo no encontráramos ninguna muestra que contuviera a este microorganismo concuerda con trabajos realizados en otras partes de mundo como Abong'ó *et al.*, (2008), donde evaluaron 180 muestras de vegetales (col, zanahoria, pepino, cebolla y espinacas) en África del Sur detectando solo cuatro muestras contaminadas con este microorganismo. Del mismo modo en el 2003 y 2004, Mukherjee *et al.*, no lograron aislar a esta bacteria partir de ninguna de las 476 muestras analizadas de 32 cultivos orgánicos y convencionales de tomates, lechugas, pimiento verde, repollo, pepino, fresas y manzanas entre otras. Huang *et al.* (2005), demostraron la presencia de *E. coli* O157:H7 aunque en baja proporción, en lechuga, col, pepino y hojas de alfalfa (Huang, *et al.* 2005).

En nuestro caso obtuvimos 22 muestras presuntivas positivas para la presencia de este patógeno mediante el sistema miniVIDAS®, sin embargo al ser confirmadas por serología y PCR éstos fueron negativos. Con respecto a esto, se ha encontrado que el sistema miniVIDAS® en el caso particular de la detección de *E. coli* O157:H7 se ve influenciado por la cantidad de flora acompañante que está presente en los vegetales. Huang *et al.* (2005), reportaron que cuando bacterias como *Morganella morganii* RV-1 y *Enterobacter cloacae* RV-2 están presentes en los vegetales en una cantidad de 5×10^5 UFC/g junto con *E. coli* O157:H7, el equipo miniVIDAS® no es capaz de detectar a *E. coli* O157:H7. Además, para este patógeno, ellos encontraron falsos positivos, sobre todo cuando el patógeno se encuentra en bajas concentraciones.

También se ha observado que es posible que algunas especies de bacterias que presentan estructura similar en el antígeno “O” den falsos-positivos en el sistema miniVIDAS®. Como en un estudio realizado en 1997 donde *Citrobacter freundii*, *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Tennessee dieron falsos-positivos para *E.coli* O157:H7 debido a la similitud de sus antígenos “O” (Huang, *et al.*, 2005; Melvina 1997).

Medidas preventivas

Existen numerosas fuentes de contaminación a las que las frutas y hortalizas están expuestas, las cuales pueden darse durante el manejo pre-cosecha o post-cosecha. Este último, incrementa la concentración de microorganismos en el producto lo que puede ocurrir por el contacto con manos contaminadas, el agua de lavado, el contacto con superficies, el contacto con animales y/o sus desechos, o con otro producto que esté contaminado (contaminación cruzada) (Ailes, *et al.*, 2008).

Odumeru, *et al.*, (1997), realizaron un estudio en el que evaluaron la presencia de microorganismos indicadores y patógenos en alimentos listos para el consumo hechos a base de vegetales, obteniendo resultados en donde la cuenta de microorganismos mesófilos presentes en estos alimentos aumentaron a medida que el tiempo de almacenamiento se prolongó, alcanzando cuentas de hasta 8×10^8 UFC/g a una temperatura de 10°C, sin embargo no aislaron ningún microorganismo patógeno (Odumeru *et al.*, 1997).

Se ha reportado que las bacterias patógenas pueden desarrollarse aun con el abuso de la temperatura y tiempo, así como la falta de refrigeración del producto (Sivapalasingam, *et al.*, 2004) e incluso son capaces de sobrevivir a pesar de la aplicación de métodos de desinfección (Annous, *et al.*, 2004; Bari, *et al.*, 2008). Es por eso, que se debe tener un buen control en el manejo de estos productos ya que se debe tener cuidado en cada paso de su procesamiento haciendo para ello un análisis minucioso de riesgos, y las medidas preventivas que se deben tener. Tanto en los

supermercados y mercados populares muchas veces no se toman en cuenta estos puntos, sobre todo la humedad y temperatura, ya que si se lograrán controlar estos parámetros las cuentas de microorganismos indicadores podrían bajar, y no ser problema en pérdida del producto, ni posible daño a la salud del consumidor (Saroj, *et al.*, 2006).

Se ha encontrado, que en muchas ocasiones el tratamiento de lavado que se les da a estos productos, no es efectivo al 100% ya que sólo al lavar con agua se puede eliminar tierra y otros *detritus* orgánicos que pueda traer el producto, y se puede reducir la carga de patógenos solo 1 a 2 log UFC/g. Si la contaminación está limitada solo a la superficie, los tratamientos como el lavado y cepillado pueden ser efectivos, sin embargo algunos productos como los melones y los fresas, tienen superficies muy complejas y difíciles de limpiar, lo cual puede ser aprovechado por los patógenos para adherirse a la superficie y así contaminar el producto al momento de su manipulación (Sivapalasingam, *et al.*, 2004, Stringer, *et al.*, 2007).

Las barreras físicas como la cascara, que tienen estos productos, no necesariamente previenen su contaminación, ya que los microorganismos son capaces de penetrar estas barreras en ciertas condiciones a través de agua de lavado (Hammack, *et al.*, 2004). Por ejemplo, cuando los productos, como tomate, germinados, manzanas y mangos, son sumergidos en agua helada, se provoca un cambio de presión, la diferencia de ésta permite a los patógenos que se encuentran presentes en el agua a entrar hacia el centro del producto (Sivapalasingam, *et al.*, 2004).

Johnston, *et al.*, (2005), realizaron una comparación sobre el aumento y disminución de la cantidad de microorganismos presentes en el producto a lo largo de la cadena, desde el embalaje hasta el punto de venta, obteniendo para los productos vegetales un aumento de la carga microbiana alrededor de 1 log UFC/g después del tratamiento de lavado. Este es un claro ejemplo de que aunque el producto reciba un tratamiento de lavado no lo hace susceptible a que no presente microorganismos.

Se sabe que el cloro es un desinfectante efectivo para el agua potable y como desinfectante de superficie, y es menos efectivo en la reducción de la carga de microorganismos de cada producto. El agua clorada generalmente puede reducir la carga microbiana de la superficie de un producto solo de 1 a 2 log (Johnston, *et al.*, 2005). Numerosos estudios han puesto de manifiesto la efectividad del cloro para la disminución de la carga de microorganismos patógenos. Esto se ha estudiado con *Salmonella* spp. y se ha encontrado que cuando los vegetales contaminados son lavados con agua clorada (2ppm) hubo una reducción de esta bacteria, bacterias mesófilas aerobias y de los coliformes totales. A su vez estos mismos autores mencionan que aun cuando se tenga un tratamiento de lavado, el producto sigue susceptible a contaminación durante las etapas siguientes de manipulación, concluyendo la importancia de dar seguimiento a las medidas de manipulación adecuadas (Akins, *et al.*, 2008).

Además, se ha establecido que la contaminación cruzada es un factor importante durante el almacenamiento del producto, lo cual puede ocurrir debido al equipo que se utiliza durante su almacenamiento, la maquinaria de transporte y el manejo humano del producto (Knabel, *et al.* 2003; Izumi, *et al.* 2004). Una medida preventiva para esto sería implementar prácticas de higiene para el manejo de estos productos, lo que contribuiría a reducir la probabilidad de contaminación. Entre dichas prácticas podrían incluirse el mejoramiento de la higiene personal de los trabajadores, el monitoreo de los residuos de cloro en el agua de lavado y/o hielo, desinfección de las superficies y el mejoramiento de la bioseguridad en general (Ailes, *et al.*, 2008).

Sin embargo, y con todo lo anterior, para reducir los riesgos de enfermedades, la FDA recomienda a los consumidores lavar los productos con agua fría antes de ser consumidos, además de cepillar y quitar las áreas dañadas (Sivapalasingam, *et al.*, 2004).

Para causar enfermedad los patógenos que pueden presentarse en las frutas y hortalizas necesitan sobrevivir y reproducirse manteniendo la dosis mínima infecciosa mientras son consumidos por los humanos (Sivapalasingam, *et al.*, 2004).

Nuestros resultados mostraron que el producto donde se detectó la mayor cantidad de microorganismos y las cuentas elevadas de microorganismos indicadores fue el perejil. Se tiene bien documentado la asociación de microorganismos patógenos al consumo de perejil (Naimi, *et al.*, 2003; Wu, *et al.*, 2002), tal es el caso del brote de shigelosis durante Julio y Agosto del 1998 causado por una cepa de *Shigella sonnei* en Estados Unidos y Canadá. El brote se atribuyó al consumo de perejil proveniente de México en cuatro restaurantes de ese país. Lo comestible de esta planta son las hojas principalmente lo cual lo hace susceptible a la colonización de microorganismos. Laben (1988) demostró que las áreas alrededor de las venas en las hojas aumentan la humedad lo que permite que se almacene una alta concentración de bacterias en estas. Con respecto a los nutrientes presentes en el producto, la glucosa y la fructosa son los azúcares más abundantes presentes en las hojas, con lo que hace posible que patógenos como los aislados en este estudio en el perejil sean capaces de utilizar estos azúcares simples como fuente de carbono, y poder desarrollarse en el perejil. Sin embargo, para que estos patógenos se desarrollen en la superficie de las hojas y alcancen la dosis infecciosa, es necesario que existan otros factores como concentraciones de nitrógeno y/o oxígeno, al igual que temperatura y humedad adecuados (Brandl and Mandrell, 2002; Turkey, 1970; Marcier and Lindow, 2000; Wilson and Lindow 1994). Algunos resultados, como los reportados por Barak, *et al* (2008) demostraron que *Salmonella* serovar Thompson es capaz de alcanzar niveles significativos en la filosfera del cilantro cuando es inoculada a bajas concentraciones (Barak, *et al.*, 2008).

En base a los resultados obtenidos en nuestra investigación se rechaza la hipótesis nula planteada en la investigación donde se establecía que nuestros vegetales evaluados contenían bajas cuentas de microorganismos indicadores y no había presencia de patógenos. Esta investigación contribuye al conocimiento sobre la calidad

microbiológica de frutas y hortalizas en nuestra región en punto de venta, determinando afortunadamente la baja incidencia de ciertos patógenos, no así las cuentas de microorganismos indicadores, los cuales además de aumentar la probabilidad del desarrollo de patógenos, pudiera afectar la calidad de dichos productos.

CONCLUSIONES

- ❖ Las muestras analizadas de vegetales, presentaron cuentas moderadamente altas de microorganismos indicadores, comparadas con lo que indica las Normas Oficiales Mexicanas para este tipo de productos (1.5×10^5 UFC/g para el caso de mesófilos aerobios y 100 NMP/g de coliformes).
- ❖ De las 50 muestras de analizadas de perejil, seis (12%) fueron positivas para *Clostridium perfringens* no enterotoxigénico, 1 (2%) para *Salmonella* Typhi, 1 (2%) para *Listeria monocytogenes* y 1 (2%) para *Campylobacter lari*.
- ❖ En ninguna de las 300 muestras analizadas se detectó *Shigella* spp. ni *E. coli* O157:H7.
- ❖ El sistema automatizado miniVIDAS® no detectó a *L. monocytogenes* en baja concentración, sin embargo, se puede recuperar a partir de los caldos de enriquecimiento usados en dicho protocolo.
- ❖ La presencia de microorganismos patógenos en nuestro estudio no fue alta, sin embargo, puede representar un factor de riesgo hacia los consumidores si no se realiza un tratamiento adecuado de lavado y desinfección del producto.
- ❖ La hortaliza que presentó mayor contaminación en cuanto a los microorganismos indicadores y patógenos fue el perejil y la muestra que presentó menos contaminación fue el tomate.
- ❖ No hubo diferencias significativas entre los dos tipos de sitios de recolección de las muestras analizadas, ya sea supermercados o mercados populares.

LITERATURA CITADA

Abdul-Raouf UM, Beuchat LR, Ammar MS. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. Appl. Environ. Microbiol. 59(7):1999-2006.

Abong'o BO, Momba MNB, Mwambakana JN. 2008. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 in vegetables sold in the Amathole district, Eastern Cape Province of South Africa. J. Food Prot. 71(4):816-819.

Aguado V, Vitas AI, García-Jalón I. 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. Int. J. Food Microbiol. 90:341-347.

Ailes EC, Leon JS, Jaykus LA, Johnston LM, Clayton HA, Blanding S, Kleinbaum DG, Backer LC, Moe CL. 2008. Microbial concentrations on fresh produce are affected by postharvest processing, importation, and season. J. Food Prot. 71(12):2389-2397.

Akins ED, Harrison MA, Hurst W. 2008. Washing practices on the microflora on Georgia-grown cantaloupes. J. Food Prot. 71(1):46-51.

Alcoba JF, Perez RE, Gonzalez LS, Méndez AS. 2005. Outbreak of *Shigella sonnei* in a rural hotel in la gomera, canary islands spain. Int. Microbiol. 8:133-136.

Altekruse SF, Cohen ML, Swerdrow DL. 1997. Emerging food borne diseases. Emer. Infect. Dis. 3(3):285-93.

Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. 1999. *Campylobacter jejuni*- an emerging foodborne pathogen. Emerg. Infect. Diseases. 5:28-35.

Annous B, Solomon EB, Cooke PH, Burke A. 2005. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on cantaloupe melons. J. Food Safety. 25:276-287

Annous BA, Burke A, Sites JE. 2004. Surface pasteurization of whole fresh Cantaloupes inoculated with *Salmonella* Poona or *Escherichia coli*. J. Food Prot. 67(9):1876-1885

Anuario Estadístico de la Secretaría de Salud 2002. Sistema Nacional de Información de Salud [Internet]. México. Disponible en el sitio de red:
<http://sinais.salud.gob.mx/publicaciones> [Revisado el 2 Abril 2008].

Arredondo AG. 2009. EU, destino del 58% de las exportaciones michoacanas. Morelia, Mich. México. [internet] Disponible en el sitio de red:
http://www.campomexicano.gob.mx/portal_sispro/noticias.php?id_noticia=45.
[Revisado el día 4 Agosto 2009]

Arthur L, Jones S, Fabri M, Odumeru J. 2007. Microbial Survey of Selected Ontario-Grown Fresh Fruits and Vegetables. J. Food Prot. 70(12):2864-2867

Avendaño R.B., Schwetesius R. R., Lugo M. S. 2002. Reporte de investigación 64 Inocuidad de hortalizas ¿Beneficio para el consumidor o nueva barrera al comercio?. Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM) Universidad Autónoma de Chapingo [internet] Disponible en el sitio de red:
<http://www.fao.org/ag/agn/fv/files/inocuidad.pdf>. [Revisado el día 6 de Agosto 2009].

Bacteriological Analytical Manual *Online*. 2001. *Campylobacter* Capítulo 7 [internet] Disponible en el sitio de red:
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm072616.htm>. [Revisado el 31 de julio del 2009].

Bacteriological Analytical Manual *Online*.2001.*Clostridium perfringens*, Capítulo 16 [internet] Disponible en el sitio de red:

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070878.htm>. [Revisado el 31 de julio del 2009].

Bacteriological Analytical Manual *Online*.2001.*Shigella*, Capítulo 6 [internet] Disponible en el sitio de red:

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070789.htm>. [Revisado el 31 de julio del 2009].

Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J. 2002. Acid tolerance of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. J. Appl. Microbiol. 93:479-486.

Bakkenes LV, Beumer RR, De Jonge R, VanLeusden FM, De Jong AEI. 2008. Quantification of *Campylobacter jejuni* cross-contamination via hands, cutlery, and cutting board during preparation of a chicken fruit salad. J. Food Prot.71(5):1018-1022

Barack JD, Goroski L, Naraghi-Arani P, Charkowski AO. 2005. *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. Appl. Environ. Microbiol. 71(10):5685-5691

Bari ML, Inatsu Y, Isobe S, Kawamoto S. 2008. Hot water treatments to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in mung bean seeds. J. Food Prot. 71(4):830-834.

Bernstein N, Sela S, Pinto R, Ioffe M. 2007. Evidence for internalization of *Escherichia coli* into the aerial parts of maize via the root system. J. Food Prot. 70(29):471-475.

Berstein N, Sela S, Neder-Lavon S. 2007. Assessment of contamination potential of lettuce by *Salmonella* enteric serovar Newport added to the plant growing medium. J. Food Prot. 30(7):1717-1722

Beuchat L R, Ryu J H. 1997. Produce handling and processing. Emerg. Infect. Diseases 1997. 3(4):459-65.

Beuchat LR. 1996. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. Food Cont. 7(4/5):223-228.

Beuchat LR. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J. Food Prot. 59(2):204-216

Beuchat, LR,. 1992. Surface disinfection of raw produce. Dairy Food Environ. Microbiol. 68:4127-4129

Bihn AE, Suslow TV, Gravani RB, Pritts MP, Worobo R. Good agricultural practices an overview for growers and packers [internet]. USA. Disponible en el sitio de red: http://www.gaps.cornell.edu/Educationalmaterials/GAPsCDPPTS/GAPs_An_overview_for_growers_and_packers.pdf. [Revisado 14 de mayo 2009].

Blysick-Mckennal D, Schaffner DW. 1994. Prediction of Most Probable Number of *Listeria monocytogenes* using a generalized liner model and a modified FDA *Listeria* isolation method. J Food Prot. 57(12):1052-1056

Bohaychuck VM, Bradburry RW, Dimock R, Feher M, Gensler GE, King RK, Rieve R, Romero P. 2009. A microbial survey of selected alberta-grown fresh produce from farmers`markets in Alberta, Canada. J. Food Prot. 72(2):415-420

Boletín Semanal de Epidemiología Secretaría de Salud Enfermedades Infecciosas y parasitarias del aparato digestivo. Semana 45. Del 4 al 10 de noviembre de 2007. [internet] México. Disponible en el sitio de red:

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem45/index.htm> [Revisado 17 marzo 2008].

Boletín Semanal de Epidemiología Secretaría de Salud Enfermedades Infecciosas y parasitarias del aparato digestivo. Semana 52 2007. [internet] México. Disponible en el sitio de red: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem52/index.htm> [Revisado 17 marzo 2008].

Boletín Semanal de Epidemiología Secretaria de Salud Enfermedades Infecciosas y parasitarias del aparato digestivo. Semana 22. Del 31 de mayo al 6 de junio de 2009 [internet] México. Disponible en el sitio de red:

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem22/index.htm> [Revisado 15 junio de 2009].

Borbolla ME, Vidal PMR, Piña GOE, Ramírez IM, Vidal VJ. 2004. Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, *Salmonella*, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003. Salud en Tabasco. 10(1):222-232.

Bowen A, Fry A, Richard G, Beuchat L. 2006. Infection associated with cantaloupe consumption: a public health concern. Epidemiol. Infect. 134:675-685.

Brackett RE. 1987. Microbiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. J. Food Quality. 10:195-206.

Brackett RE. 1997. Frutas, hortalizas y granos. En: Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y Fronteras, Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). Acribia: España, pp. 121-129.

Brandl M. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Ann. Rev. Phytopathology*. 44:367-392.

Brandl MT, Mandrell RE. 2002. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3614-3621

Brinton WF, Storms P, Blewett TC. 2009. Occurrence and levels of fecal indicators and pathogenic bacteria in market-ready recycled organic matter compost. *J. Food Prot.* 72:332-339.

Brooks FG, Butel JS, Morse SA. 1999. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. El Manual Moderno: México DF, pp. 223-283

Brown PE, Christensen OF, Clough HE, Diggle PJ, Hart CA. 2004. Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(11):6501-6511.

Buchanan RL, Edelson SG, Miller RL, Sapers GM. 1999. Contamination of intact apples after immersion in an aqueous environment containing *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 62:444-450.

Buswell CM, Herlihy YM, Lawrence LM, McGuiggan, JTM, Marsh PD, Keevil CW, Leach SA. 1998. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. In water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and-rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol* 64:733-741.

Cabedo L, Picart LB, Teixidó AC. 2008. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready- to eat food in Catalonia, Spain. *J. Food Prot.* 71(4):855-859.

Cabrera ED, Pérez MJA. 1999. *Escherichia coli*. En: Agentes Patógenos Transmitidos por Alimentos Volumen I, Torres MV (ed.). Universidad Autónoma de Guadalajara: México, pp. 175-219

Callejo R, Prieto M, Martínez C, Agurre L, Rocca F, Martínez G. 2008. Manual de Procedimientos. Aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*. WHO Global Salm Surv. [internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.panalimentos.org/salmsurv/file/manuales/Manual%20de%20Listeria%20monocytogenes%202008.pdf> [Revisado el 15 de octubre 2008].

Casillas AA. 1999. *Campylobacter*. En: Agentes Patógenos Transmitidos por Alimentos Volumen I, Torres MV (ed.). Universidad Autónoma de Guadalajara: México, pp. 175-219

Carrasco E, Pérez RF, Valero A, García GRM, Zurera G. 2007. Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy green salads: risk factors for Listeriosis. J. Food Prot. 70(10):2407-2412.

Castillo A, Mercado I, Lucía LM, Martinez RY, Ponce J, Murano EA, Acuff GR. 2004. *Salmonella* contamination during production of cantaloupe: a binational study. J. Food Prot. 67(4):713-720

Castillo A, Villarruel AL, Navarro HV, Martínez GNE, Torres VMR. 2006. *Salmonella* and *Shigella* in freshly squeezed orange juice, fresh oranges, and wiping cloths collected from public markets and street booths in Guadalajara, Mexico: incidence and comparison of analytical routes. J. Food Prot. 69(11): 2595-2599.

Castro RJ, Rojas-Olvera M, Noguera-Ugalde Y, Santos-López EM. 2006. Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo. Rev. Indus. Alim.

18:9-21 Disponible en el sitio de red: <http://www.alfa-editores.com/alimentaria/Julio-Agosto06/calidad.pdf> [Revisado el 2 abril 2008].

CDC, 1999. Outbreaks of *Shigella sonnei* infection associated with eating fresh parsley—United States and Canada, July–August 1998. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 48:285–289.

CDC, 2000. Public health dispatch: outbreak of *Shigella sonnei* infections associated with eating a nationally distributed dip—California, Oregon, and Washington, January 2000. Morb.Mortal. Wkly. Rep., 49:60–61.

CDC, 2006. Summary Statistics for Foodborne outbreak 2006. [Internet] Disponible en el sitio de red http://www.cdc.gov/foodborneoutbreak.guide_fd.htm [Revisado 2 abril 2008].

CDC. 2002 Multistate outbreaks of *Salmonella* serotype *Poona* infections associated with eating cantaloupe from México, United States and Canada,2000-2002. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/MMWR/preview/mmwrhtm/mm514602.htm> [Revisado el día 2 abril 2008].

CDC. 2002. Data surveillance for foodborne disease outbreak-United States 1998-2002. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/mmWR/PDF/ss/ss5510.pdf>. [Revisado 1 Agosto 2009].

CDC, 2008. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states. United States. June 6, 2008. Morb. Mort. [internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5813a2.htm>. [Revisado el día 6 de Agosto del 2009].

Cetinkaya F, Cibik R, Soyutemiz GE, Ozakin C, Kayali R, Levent B. 2008. *Shigella* and *Salmonella* contamination in various foodstuffs in Turkey. Food Cont. 19:1059-1063.

Chalker RB, Blaser MJ. 1988. A review of human salmonellosis: III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. Rev Infect Dis. 10: 111-124.

Chen Y, Ross WH, Scott VN, Gombas DE. 2003. *Listeria monocytogenes*: low levels low risk. J. Food Prot. 66(4):570-577

Ching LC, Robin T, Ragavan UM, Gunsalam JW, Bakar FA, Ghazali FM, Radu S, Kumar MP. 2007. Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia. Inter. J. Food Microbiol. 117:106-111.

Cloak OM, Fratamico PM. 2002. A Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Swine Processing Facility and Characterization of Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Antibiotic Resistance Profiles. J. Food Prot. 65(2):266-273.

Comunidad Andina, 2004. Seguimiento del comercio de México con Estados Unidos. México. SG/de091.[Internet] Disponible en el sitio de red:
<http://www.comunidadandina.org/estadisticas/SGde091.pdf>. [Revisado 1 Agosto 2009].

Cosby DE, Bailey JS. 2007. Comparison of the TEMPO®System, Petrifilm®, and cultural MPN procedure for enumeration of *E. coli*, coliforms and total aerobic plate Counts. Int. Asso. Food Prot.58:161.

Crowley ES, Bird PM, Torontali MK, Agin JR, Goins DG, Johnson R. 2009. TEMPO®CTV for enumeration of aerobic mesophilic flora in foods: collaborative study. J. AOAC. Int. 92(1):165-174.

Cuellar SR. 2002. Marketing Fresh fruit and vegetable imports in the United States: status, challenges and opportunities [internet]. Food Industry Management Cornell University. Disponible en el sitio de red:

http://hortmgt.aem.cornell.edu/pdf/smart_marketing/cuellar3-03.pdf [Revisado 20 Julio 2009].

D'Aoust JY. 1997. Especies de *Salmonella*. En: Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y Fronteras, Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). Acribia: España, pp. 133-164.

D'Aoust JY. 2001. *Salmonella*. In: Guide to foodborne pathogens, Labbé RG, García S (eds). Wiley Inter-Science: USA, pp. 163-185.

Danhorn T, Fuqua C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annu. Re. Microbiol. 61:401-422.

Datta RA. 2003. *Listeria monocytogenes*. In: International handbook of pathogens, Miliotis MD, Bier JW (eds). Marcel Dekker: USA, pp. 105-121.

De Cesare A, Sheldon BW, Smith KS, Jaykus LA. 2003. Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surface. J. Food Prot. 66(9):1587-1594.

De Waal CS, Johnson K, Bhuiya F. 2007. Outbreak Alert! 2006. Center for science in the public interest [internet] Disponible en el sitio de red:

http://www.cspinet.org/foodsafety/outbreak_alert.pdf. [Revisado el 2 de junio del 2009].

Deisingh AK, Thompson M. 2004. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. J. Appl. Microbiol. 96:419-429

Del Mar Gamboa M, Rodriguez E, Vargas P,.2005. Diversity of mesophilic clostridia in Costa Rican soils. *Anaerobe*. 11: 322-326.

Delaquis P, Bach S, Dinu LD. 2007. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables. *J. Food Prot.* 70(8):1966-1974.

Delhalle L, De Sadeleer, Bollaerts, Farnir F, Saegerman C, Korsak, Dewulf, De Zutter, Daube G. 2008. Risk factors for *Salmonella* and hygiene indicators in the 10 largest belgian pig slaughterhouses. *J. Food Prot.* 71(7):1320-1329.

Denisen EI. 1991. Fundamentos de horticultura. Limusa. México, pp. 47-48.

Díaz SR, Vernon CJ. 1999. Inocuidad microbiológica de frutas frescas y mínimamente procesadas. *Cien. Tecn. Aliment.* 2:133-136.

Diop N, Jaffe SM. 2005. Fruits and vegetables: global trade and competition in fresh and processed product market. in: global agriculture trade and developing countries. [Internet] Disponible en el sitio de red:
<http://siteresources.worldbank.org/INTGAT/Resources/GATChapter13.pdf>. [Revisado el día 6 de Agosto 2009].

Donnelly CW. 2001. *Listeria monocytogenes*. In: Guide to foodborne pathogens, Labbé RG, García S (eds). Wiley Inter-Science: USA, pp. 99-123.

Doyle MP, Barrel TJ, Wells JG, Griffin PM. 1993. An outbreak of diarrhea and haemolytic uremic syndrome from *E.coli* O157:H7 in fresh pressed apple cider. *J. Amer. Med. Associa.* 269:2217-2220

Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. En: Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). Acibia: España, pp. 177-197.

Dreux N, Albagnac C, Carlin F, Morris CE, Nguyen TC. 2007. Fate of *Listeria* spp. On parsley leaves grown in laboratory and field cultures. J. Appl. Microbiol. 103:1821-1827.

Drobniewski FA. 1993. *Bacillus cereus* and related species. Cli. Microbiol. Rev. 6(4):324-338

Duffy EA, Lucia LM, Kells JM, Castillo A, Pillai SD, Acuff GR. 2005. Concentrations of *Escherichia coli* and genetic diversity and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from irrigation water, packing shed equipment, and fresh produce in Texas. J. Food Prot. 68:70-79.

European Commission Health & Consumer Protection Report of the Scientific Committee on Food, 2002. Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. Bélgica. SCF/CS/FMH/SURF/Final. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index> [Revisado el 18 octubre 2008].

Evans MR, Ribeiro CD, Salmon RL. 2003. Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for *Campylobacter* infection. 2003. Emerg. Infect. Dis. 9(10):1219-1225.

FAO, 2005. Major food and agricultural commodities and producers. economic and social department statistics division. [internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en&item=619&year=2005>. [Revisado el 31 de julio 2009].

FAO/WHO.1993. The role safety in health and development. Report of The joint expert committee on food safety. Geneva: World Health Organization. [internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.popline.org/docs/1434/028006.html>. [Revisado el día 30 marzo del 2007].

Farber JM, Peterkin PI. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev. 55(3):476-511.

Farber JM, Sanders GW, Johnston MA. 1989. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. J. Food Prot. 52:456–458.

Farber JM, Wang SL, Cai Y, Zhang S. 1998. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. J. Food Prot. 61(2):192-195.

FDA, 1998. Import Alert #21-12, Detention without physical examination of frozen and refrigerated guacamole and processed avocado”. USA [internet] Disponible en el sitio de red: http://www.accessdata.fda.gov/ImportAlerts/ora_import_ia2112.html. [Revisado el día 4 de Agosto 2009].

FDA, 1998. Import Alert #24-21, Detention without physical examination of parsley and cilantro from agricola herendira, Mexico due to *Shigella sonnei*. Disponible en el sitio de red: http://www.accessdata.fda.gov/ImportAlerts/ora_import_ia2421.html [Revisado el día 4 de Agosto 2009].

FDA, 2002. Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas manual de formación para instructores. USA. Disponible en el sitio de red: http://www.jifsan.umd.edu/pdf/gaps_es/INTRODUCCION.pdf. [Revisado el día 4 de Agosto 2009].

Feng P. 2001. *Escherichia coli*. In: Guide to foodborne pathogens, Labbé RG, García S (eds). Wiley Inter-Science: USA, pp. 143-160.

Fernández EE. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México, pp 220-460.

Figueroa GAA, Ramírez MG, Molina GA, Yañez GR, Espinoza NJ, Sena EMA, Carranza JM. 2005. Identificación de *Salmonella* spp en agua, melones cantaloupe y heces fecales de iguanas en una huerta melonera. Med. Int. Mex. 21:255.258.

Foster G, Hopkins GF, Gunn GJ, Ternent HE, Carter FT, Knight HI, Graham DJL, Edge V, Synge BA. 2003. A comparison of two pre-enrichment media prior to immunomagnetic separation for the isolation of *E. coli* O157 from bovine faeces. J. Appl. Microbiol. 95:155-159

Foster J, Hall HK. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella Typhimurium*. J. Bacteriol. 172:771-778.

Francis GA, Thomas C, O'Breirne D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. Inter. J. Food Science and Technology. 34:1-22.

Frazier WC, Westhoff DC. 1993. Microbiología de los alimentos. Acriba: España, pp. 72

Fröder H, Geraldés C, Olivera KL, Langraf M, Franco BD, Destro MT. 2007. Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. J. Food Prot. 70(5): 1277-1280

Fu TJ, Reineke KF, Chirtel S, VanPelt OM. 2008. Factors influencing the growth of *Salmonella* during sprouting of naturally contaminated alfalfa seeds. J. Food Prot. 71(5):888-896

Fuente FA, Compas BON, Meza MM. 2005. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de Ciudad Obregón Sonora México. Rev. Salud Pública Nutr. 6 (3)

Gallegos MA, Morales AL, Álvarez GO, Vega AP, Chew YM, Velarde S, Fratamico P. 2008. Identification of *Salmonella* serotypes isolated from cantaloupe and chile pepper production systems in Mexico by pcr-restriction fragment length polymorphism. J. Food Prot. 71(11):2217-2222

García TSG. 2008. Prevalencia de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica* en carne de cerdo en punto de venta y heces de humanos. Tesis. (Licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León.

Garg, N, Churey JJ, Splittstoesser DF. 1990. Effect of processing conditions on the microflora of fresh cut vegetables. J. Food Prot. 53:701-703.

Girardin H, Morris CE, Albagnac C, Dreux N, Glaux C, Nguyen C. 2005. The Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. FEMS Microbiol. Ecol. 54:287-295

Gombas DE, Chen Y, Clavero RS, Scott V. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. J. Food Prot. 66(4):559-569

González FT, Rojas HRA. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Rev. Salud Pública Méx. 47[5]:388-390

Gorski L, Flaherty D, Duhé JM. 2008. Comparison of the stress response of *Listeria monocytogenes* strains with sprout colonization. J. Food Prot. 71(8):1556-1562.

Goutam KA, Meakins M, Yip H, Lopman BA, O'brien L. 2005. Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. Emer. Infect. Diseases. 11(3):365-372

Guan T Y, Blank G, Ismond A, Acker RV. 2001. Fate of foodborne bacterial pathogens in pesticide products. J. Sci. Food Agric. 81:503–512.

Guerra MM, McLauchlin J, Bernardo FA. 2001. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. Food Microbiol. 18:423–429.

Hammack TS, Valentin-Bon IE, Jacobson AP, Andrews WH. 2004. Relative effectiveness of the Bacteriological Analytical manual method for the recovery of *Salmonella* from whole cantaloupes and cantaloupe rinses with selected preenrichment media and rapid methods. J. Food Prot. 67(5): 870-877.

Heaton JC, Jones K. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behavior of enteropathogens in the phyllosphere: a review. J. Appl. Microbiol. 104:613-626.

Hedberg CW, Angulo FJ, White KE, Langkop CW, Schell WL, Stobierski MG, Schuchat A, Besser JM, Dietrich S, Helsel L, Griffin PM, McFarland JW, Osterholm MT. 1999. Outbreaks of salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: implications for public health. Epidemiol. Infect. 122:385–393.

Heisick JE, Wagner DE, Nierman ML, Peeler JT. 1989. *Listeria* spp. Found on Fresh Market Produce. Appl. Environ. Microbiol. 55(8):1925-1927.

Heredia NL, García GA, Luévanos R, Labbé RG, García JS. 1997. Evaluation of the heat resistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* type A by sublethal heat shock. J. Food Prot. 60(8):998-1000.

Heredia NL, García JS. 1999. *Clostridium perfringens* En: Agentes Patógenos Transmitidos por Alimentos Volumen I, Torres MV (ed.). Universidad Autónoma de Guadalajara: México, pp. 159-173.

Heredia NL, Labbé RG. 2001. *Clostridium perfringens*. In: Guide to Foodborne Pathogens, Labbé RG, García S (eds). Wiley Inter-Science: USA, pp. 133-140.

Hirotsu H, Naranjo J, Moroyoqui PG, Gerba CP. 2001. Demonstration of indicator microorganisms on surface of vegetables on the market in the United States and Mexico. J. Food Science. 67:1847-1850.

Hora R, Warriner K, Shelp BJ, and Griffiths MW, 2005. Inactivation of human pathogens and spoilage bacteria on the surface and internalized within fresh produce by using a combination of ultraviolet light and hydrogen peroxide. J. Appl. Microbiol. 104(4):1014-1024.

Hu L, Kopecko DJ. 2003. *Campylobacter* Species. In: International Handbook of Pathogens, Miliotis MD, Bier JW (eds). Marcel Dekker: USA, pp. 181-198.

Hu L, Kopecko DJ. 2003. Salmonella. In: International handbook of pathogens, Miliotis MD, Bier JW (eds). Marcel Dekker: USA, pp. 151-165.

Huang CC, Yang YR, Liao SM, Chang PP, Cheng CY. 2005. Development of a modified enrichment method for the rapid immunoassay of *Escherichia coli* O157 strains in fresh cut vegetables. J. Food Prot. 13(1): 64-70

Ilic S, Odomeru J, Lejeune JT. 2008. Coliforms and prevalence of *Escherichia coli* and foodborne pathogens on minimally processed spinach in two packing plants. J. Food Prot. 71(12):2398-2403

ICMSF. 1980. Ecología microbiana de los alimentos. Vol. II. Acriba: España, pp. 613-652.

Islam M, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiaang X. 2004. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and leaf lettuce and parsley grown in field treated with contaminated manure composts or irrigation water. J. Food Prot. 67(7):1365-1370

Izumi H, Poubol J, Hisa K, Sera K. 2008. Potential sources of microbial contamination of satsuma mandarin fruit in Japan, from production through packing shed. J. Food Prot. 71(3):530-538

Jacobson AP, Johnson ML, Hammack TS, Andrews WH. 2002. Evaluation of the Bacteriological Analytical Manual (BAM) culture method for the detection of *Shigella sonnei* in selected types of produce. [poster] FDA Science Forum. February 20–21; Washington, D.C.

James MJ. 1992. Microbiología moderna de los alimentos. Acriba: España, pp. 25-42.

Jiménez LT, Martín MC. 2004. Vigilancia epidemiológica de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Castilla y León (II) (Años 1987 a 2003). Bol. Epidemiol. Castilla y León. 20(5):25-32

Johannessen GS, Loncarevic S, Kruse H. 2007. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. Int. J. Food Microbiol. 77:199-204

Johnston LM, Jaykus LA, Moll D, Anciso J, Mora B, Moe CL. 2006. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *Int. J. Food Microbiol.* 112:83-95

Johnston LM, Jaykus LA, Moll D, Martinez MC, Anciso J, Mora B, Moe CL. 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. *J. Food Prot.* 68(9): 1840-1847

June GA, Sherrod PS, Amaguana RM, Andrews, WA, Hammack TS. 1993. Evaluation of Bacteriological Analytical Manual culture method for the recovery of *Shigella sonnei* from selected food. *J. AOAC Int.* 76:1240-1248.

Kamber U, Gokce HI, Elmali M. 2007. *Clostridium perfringens* and its toxins in miced meat from Kars, Turkey. *Food Additives and Contaminants.* 24:673-678.

Kaneko KI, Hayashidani H, Takahashi K, Shiraki Y, Limawongpranee S, Ogawa M. 1999. Bacterial contamination in the environment of food factories processing ready-to eat fresh vegetables. *J. Food Prot.* 62(7):800-804.

Kim JM, Harrison MA. 2008. Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 to romaine lettuce due to contact water from melting ice. *J. Food Prot.* 71(2):252-256

Klontz KC, McCarthy PV, Datta AR, Lee JO, Acheson DWK, Brackett RE. 2008. Role of U.S. Food and Drug Administration in the regulatory management of human Listeriosis in the United States. *J. Food Prot.* 71(6):1277-1286.

Knabel SJ, Fatemi P, Patton J, Laborde LF, Annous B, Sapers GM. 2003. On farm contamination of horticultural products in the USA and strategies for decontamination. *Food Aust.* 55:580-582, 586.

Konishi N, Kai A, Matsushita, Noguchi Y, Takahashi Y, Sekiguchi K, Arai T, Morozumi S, and Kokubo Y. 2001. Bacterial contamination of fresh vegetables and epidemiological investigation of isolates. *Jpn. J. Food Microbiol.* 18:9-14.

Kosa KM, Cates SC, Karns S, Gowin SL, Chambers D. 2007. Consumer home refrigeration practices: results of web-based survey. *J. Food Prot.* 70(7):1640-1649.

Kumar A, Agarwal RK, Bhilegaonkar KN, Shome BR, Bachhil VN. 2001. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 67:153-155.

Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos JI. 2004. Manual de Infectología clínica. Decimosexta edición. Méndez: México, pp. 139-142.

Laben C. 1988. Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. *Phytopathology* 78:179-181.

Lampel AK, Maurelli AT. 2003. *Shigella* Species. In: International Handbook of Pathogens, Miliotis MD, Bier JW (eds). Marcel Dekker: USA, pp. 167-180.

Lapidot A, Romling U, Yaron S. 2006. Biofilm formation and survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *Int. J. Food Microbiol.* 109:229-233.

Lapidot A, Yaron S. 2009. Transfer of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium from contaminated irrigation water to parsley is dependent on curli and cellulose, the biofilm matrix components. *J. Food Prot.* 72(3):618-623.

Leclerc H, Mossel DAAA, Edberg SC, Struijk CB. 2001. Advances in the bacteriology of the coliforms group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:201-234.

Lee SY. 2004. Microbial safety of pickled fruits and vegetables and hurdle technology. *Int. J. Food Safe.* 4:21-32.

Li J, Sayeed S, McClane BA. 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7218-7224.

Lianou A, Sofos JN. 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *J. Food Prot.* 70(9):2172-2198.

Liao CH, Fett WF. 2001. Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *J. Food Prot.* 64(8):1110-1115.

Lin YT, Labbe R. Enterotoxigenicity and genetic relatdness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3):1642-1646.

Little CA, Gillespie IA. 2004. Prepared salads and public health. *J. Appl. Microbiol.* 105:1729-1743.

Long SM, Adak GK, O'Brien SJ. 2002. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales:1992 to 2000. *Int. J. Gastroent. Hepato.* 51:832-841

Loui C, Grigoryan G, Huang H, Riley LW, Lu S. 2008. Bacterial communities associated with retail alfalfa sprouts. *J. Food Protect.* 71(1):200-204.

Lucier GS, Pollack S, Ali M, Pérez A. 2006. Fruit vegetable Backgrounder. Electronic Outlook report from the economic research service United Stated Department of

Agriculture. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.ers.usda.gov/> [Revisado el 6 de mayo 2008].

Lui S, Puri VM, Demirci A. 2008. Evaluation of *Listeria innocua* as a suitable indicator for replacing *Listeria monocytogenes* during ripening of Camembert cheese. Int. J. Food Sci. Tech. 44:29-35.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2004. Brock biología de los microorganismos. Pearson-Prentice Hall. USA, pp. 951

Magnuson JA, King AD, Török. 1990. Microflora of partially processed lettuce. Appl. Environ. Microbiol. 56:3851-3854.

Malavez AY. 2005. Detección de *Campylobacter jejuni* en las incubadoras de una planta procesadora de pollos parrilleros de Puerto Rico. [Tesis] pp.3-5

Manual de Fabricante Biomeriux 2008. TEMPO.

Manual de Fabricante Biomeriux 2008. VIDAS CAM *Campylobacter* spp.

Manual de Fabricante Biomeriux 2008. VIDAS ICE

Manual de Fabricante Biomeriux 2008. VIDAS LDUO *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

Manual de Fabricante Biomeriux 2008. VIDAS SLM *Salmonella* spp.

Manual de Fabricante Biomeriux 2008. VIDAS UP *E. coli* O157:H7

Manvell PM, Ackland MR. 1986. Rapid detection of microbial growth in vegetables salads at chill and abuse temperature. *Food Microbiol.* 3:59-65.

Marchetti R, Casadei MA, Guerzoni ME. 1992. Microbial population dynamics in ready-to-use vegetables salads. *Ital. J. Food Sci.* 2, 97-108.

Marcier J, Lindow SE. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:369-374.

Martinez GNE. 1999. *Listeria monocytogenes*. En: Agentes patógenos transmitidos por alimentos Volumen I, Torres MV (ed.). Universidad Autónoma de Guadalajara: México, pp. 175-219.

Matsumoto N, Taniwaki T, Kinuta M, Murase T. 2008. Isolation of *campylobacter jejuni* and coliform bacilli from bile and liver obtained from slaughter cattle in western Japan. *J. Food Prot.* 71:1228-1231.

Maurelli AT, Lampel KA. 1997. Especies de *Shigella*. En: Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras, Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). Acribia: España, pp. 225-238.

McClane BA, 1997. *Clostridium perfringens*. En: Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras, Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). Acribia: España, pp.319-342.

McClane BA. 2003. *Clostridium Perfringens*. In: International handbook of pathogens, Miliotis MD, Bier JW (eds). Marcel Dekker: USA, pp. 91-104.

McDonald F, Sutherland AD. 1994. Important differences between the generation time of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in two *Listeria* enrichment broths. *J. Dairy Res.* 61:433-436.

McKillip JL. 2000. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie van Leeuwenhoek*. 77:393-399

McMahon MAS, Wilson IG. 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 70:155-162.

Mead PS, Slutskel DV, McCaig LF, Brosee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emer. Inf. Diseases*. 5:607-627.

Medeiros DT, Sattar SA, Farber JM, Carrillo CD. 2008. Occurrence of *Campylobacter* spp. in raw and ready-to-eat foods and in a Canadian food service operation. *J. Food Prot.* 71(10):2087-2093

Meldrum RJ, Mannion PT, Garside J. 2009. Microbiological Quality of ready-to-eat food served in schools in Wales, United Kingdom. *J. Food Prot.* 72:197-201.

Melvina K. 1997. Evaluation of an automated enzymelinked fluorescent immunoassay system for the detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.* 60:682-685.

Ministerio de Salud, 2001. Manual de procedimientos *Campylobacter*. [internet] Disponible en el sitio de red:
http://cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/ArgentinaLevelI/ManualProcedimientos_Campylobacter.pdf. [Revisado el 23 abril 2009].

Miranda JM, Mondragón AC, Martinez B, Guardon M, Rodríguez JA. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *J. Food Prot.* 72(5):966-971.

Mishu B, Blaser MJ. 1993. Role of infection due to *Campylobacter jejuni* in the initiation of Guillain-Barré syndrome. Clin. Infect. Dis. 17:104-108.

Miwa N, Masuda T, Terai K, Kawamura A, Otani K, Miyamoto H. 1999. Bacteriological investigation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning caused by Japanese food without animal protein. Int. J. Food Microbiol. 49:103-106.

Mukherjee A, Speh D, Dyck E, Diez FG. 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota Farmers. J. Food Prot. 67(5):894-900.

Mukherjee A, Speh D, Jones T, Buesing KM, Diez-Gonzalez. 2006. Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midwest. J. Food Prot. 69:1928-1936.

Nachamkin I. 1997. *Campylobacter jejuni*. En: Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras, Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). Acribia: España, pp. 165-176.

Naimi TS, Wicklund JH, Olsen SJ, Krause G, Wells JG, Bartkus JM, Boxrud DJ, Sullivan M, Kassenborg H, Besser JM, Mintz ED, Osterholm MT, Henderberg CW. Concurrent outbreaks of *Shigella sonnei* and enterotoxigenic *Escherichia coli* infections associated with parsley: implications for surveillance and control of foodborne illness. J. Food Prot. 66(4):535-541.

Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11(1):142-201.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 1999. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. Food Cont. 10:117-143.

Navarro VH. 1999. *Shigella*. En: Agentes patógenos transmitidos por alimentos Volumen I, Torres MV (ed.). Universidad Autónoma de Guadalajara: México, pp. 99-122.

Nemati M, Ghorbanpour H, Razavieh SV, Hoseini M. 2008. Chemical composition and microbiological quality of the bonab kebabs sold in tabriz market. J. Food Safety. 28:315-323.

Ng PJ, Fleet GH, Heard GM. 2005. Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables. Int. J. Food Microbiol. 101:237–250.

Nguyen-the C, Prunier J. 1989. Involvement of *Pseudomonas* in ‘ready-to-use’ salad deterioration, Int. J. Food Sci. Technol. 24:47-56.

Nguz K, Shindano J, Samapundo S, Huyghebaert A. 2004. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. J. Food Cont. 16:623-628.

NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de organismos mesofílicos aerobios. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.

NOM-093-SSA1-1994. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.

NOM-111-SSA1-1994. Mohos y Levaduras. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los estados unidos mexicanos. México D.F.

Odumeru JA, Mitchell SJ, Alves DM, Lych JA, Yee AJ, Wang SL, Styliadis S, Farber JM. 1997. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. J. Food Protec. 60:954-960.

OMS Informe Técnico N° 785. 1989. Prevención de las Enfermedades Transmitidas por los alimentos en plantas procesadoras de alimentos. Disponible en el sitio de red: <http://www.envigado.gov.co/docs/salud/PREVENCIoN%20DE%20LAS%20ENFERMEDADES%20TRANSMITIDAS%20POR%20ALIMENTOS.pdf> [Revisado 20 Noviembre 2008].

OMS,1998. Surface the contamination of fruits and vegetables eaten raw. WHO/FST/FOS/98.2 [Internet] Disponible en el sitio de red: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/surfac_decon. [Revisado el 13 de febrero 2008].

Oracová R, Trnciková T, Kuchta T, Kaclíková E. 2008. Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. J. Appl. Microbiol. 104:429-437.

Orozco LR, Iturriaga MH, Tamplin ML, Fratamico PM, Call JE, Luchansky JB, Escartin EF. 2008. Animal and environmental impact on the presence and distribution of *Salmonella* and *Escherichia coli* in hydroponic tomato greenhouses. J. Food Prot. 71(4):676-683.

Orsburn B, Melville SB, Popham DL. 2008. Factors contributing to heat resistance of *Clostridium perfringens* endospores. Appl. Environ. Microbiol. 74(11):3328-3335.

Padaga M, Heard GM, Paton JE, Fleet GH. 2000. Microbial species associated with different sections of broccoli harvested from three regions in Australia. *Int. J. Food Microbiol.* 60:15-24.

Pal A, Labuza TP, Diez GF. 2008. Evaluating the growth of *Listeria monocytogenes* in refrigerated ready-to-eat frankfurters: influence of strain temperature, packaging, lactate and diacetate, and background microflora. *J. Food Prot.* 71(9):1806-1816.

Pappelbaum K, Grif K, Heller I, Würzner R, Hein I, Ellerbroek L, Wagner M. 2008. Monitoring hygiene on- and at-line is critical for controlling *Listeria monocytogenes* during produce processing. *J. Food Prot.* 71(4):735-741.

Park CE, Sanders GW. 1992. Occurrence of thermotolerant *Campylobacters* in fresh vegetables sold at farmers outdoor markets and supermarkets. *Can. J. Microbiol.* 38:313-316.

Park YH, Seo KS, Ahn JS, Yoo AS, Kim SP. 2001. Evaluation of the petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retail meat samples. *J. Food Prot.* 64(11):1841-1843.

Parrilla CMC, Vázquez CJL, Saldate EO, Nava FLM. 1993. Brotes de toxicoinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Rev. Salud Pública México.* 35[5]:456-460.

Paulsen P, Borgetti C, Schopf E, Smulders FJM. 2008. Enumeration of *Enterobacteriaceae* in various foods with a new automated Most-Probable-Number method compared with Petrifilm and international organization for standardization procedures. *J. Food Prot.* 71(2): 376-379.

Paulsen P, Schopf E, Smulders FJM. 2006. Enumeration of total aerobic bacteria and *Escherichia coli* in minced meat and on carcass surface samples with an automated Most-Probable –Number method compared with colony count protocols. J. Food Prot. 69:2500-2503.

Penteado AL, Eblen BS, Miller AJ. 2004. Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangos during simulated postharvest insect disinfection procedures. J. Food Prot. 67:181–184.

Pesca OL. 2007. Protocolo de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Evento de vigilancia: ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS [internet] España. Disponible en el sitio de red: http://www.invima.gov.co/Invima/general/docs_general/doc_informacionalimentos/ETA_revisadomayo3.pdf [Revisado el 24 mayo 2009].

Puente ARC. 2008. Prevalencia de *Salmonella sp* y *Clostridium perfringens* en productos cárnicos que se expenden en Monterrey, Nuevo León y su área metropolitana así como en heces de humanos. Tesis. (Licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León.

Quiroz CS, Rodas ORS, Vázquez CRQ, Fernandez FJ, Quiñones EIR, Vazquez CS. 2009. Prevalence of *Salmonella* in vegetables from México. J. Food Prot. 72:1279-1282.

Raffi F, Lunsford P.1997. Survival and detection of *Shigella flexneri* in vegetables and commercially prepared salads. J. of AOAC International. 80:1191-1197.

Rahmati T, Labbe R. 2008. Levels and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from retail seafood. J. Food Prot. 71: 1178-1185.

Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. 2005. Epidemiology *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg. Infect. Diseases*. 11(4):604-609.

Reeve G, Martin DL, Pappas J, Thompson RE, Greene KD. 1989. An outbreak of shigellosis associated with the consumption of raw oysters. *N. Engl. J. Med.* 321:224–227.

Richards GM, Buck JM, Beuchat LR. 2004. Survey of yeast for antagonistic activity against *Salmonella* Poona in cantaloupe juice and wounds in rinds coinfecting with phytopathogenic molds. *J. Food Prot.* 67:2132-2142.

Riordan DCR, Sapers GM, Hankinson TR, Magee M, Matrazzo AM, Annous BA. 2001. A study U.S. orchards to identify potential source of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 64:1320-1327.

Rivas M, Leotta G, Chinen I. 2007. Manual de procedimientos diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.panalimentos.org/salmsurv/file/manuales/manualEcoli.pdf>. [Revisado el día 15 octubre 2008].

Rocourt J, Cossart P. 1997. *Listeria monocytogenes*. En: Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras, Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). Acribia: España, pp. 355-370.

Rodriguez E, Gamboa MM, Vargas P. 2002. *Clostridium perfringens* en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica. *Arch. Lat. Nutri.* 52(2):155-158.

Rodríguez MG, Peregrina RG. 1999. *Salmonella*. En: Agentes patógenos transmitidos por Alimentos Volumen I, Torres MV (ed.). Universidad Autónoma de Guadalajara: México, pp. 65-93.

Rood JI, Cole ST. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Reviews. 55(4):621-648.

Ruiz BG, Vargas RG, García RV. 1987. Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. Int. J. Food Microbiol. 4:285-291.

Sagoo SK, Little CL, Mitchell RT. 2001. The microbiological examination of ready-to-eat organic vegetables from reatail establishments in the United Kindom. Lett. Appl. Microbiol. 33: 434-439.

Sagoo SK, Little CL, Mitchell RT. 2003. Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: effectiveness of food hygiene training of management. J. Food Prot. 66(9):1581-1586.

Santos F.B., Li X., Payne J.B, y Sheldon B.W. 2005. Estimation of Most Probable Number *Salmonella* populations on commercial North Carolina turkey farms. J.Appl. Poult. Res. 14:700-708.

Saroj SD, Shashdhar R, Dhokabe V, Hajare S, Sharma A, Bandekar JR. 2006. Microbiological evaluation of sprouts marketed in Mumbai, India and its suburbs. J. Food Prot. 69:2515-1518.

Scherer K, Bartelet E, Sommerfeld C, Hilderbrandt G. 2006. Quantification of *Campylobacter* on the surface and in the muscle of chicken legs at retail. J. Food Prot. 69(4):757-761.

Schirra M, D'Aquino S, Mulas M, Melis RAM, Gobbe S, Mighell Q, GaruA, Cabras P. 2008. Efficacy of heat treatments with water and fludioxonil for postharvest control of blues and gray molds on inoculated pears and fludioxonil residues in fruits. *J. Food Prot.* 71(5):967-972.

Scott KL, Malanoski M. 1997. Imports play a growing role in the american Diet. *Food Consump.* 202:13-17.

Scott W, Song I, Choi CY, Gerba CP. 2005. Effect of relative humidity on preharvest survival of bacterial and viral pathogens on the surface of cantaloupe, lettuce, and bell peppers. *J. Food Prot.* 68:1352-1358.

Seymour IJ, Appleton H. 2001. Foodborne viruses and fresh produce. *J. Appl. Microbiol.* 91:759-773.

Shi X, Namvar A, Kostrynska M, Hora R, Warriner K. 2007. Persistence and growth of different *Salmonella* serovars on pre- and postharvest tomatoes. *J. Food Prot.* 70(12): 2725-2731.

Shoeni JL, Lee AC. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J. Food Prot.* 68(3):636-648.

Siller CJH. Sf. Situación actual de la industria hortícola en México. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. México [Internet] Disponible en el sitio de red:http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort03/Ponencia_04.pdf. [Revisado el día 1 de Agosto 2009].

Simonne AH, Nille A, Evans K, Marshal MR. 2004. Ethnic food safety trends in the United States based on CDC food borne illness data. *Food Prot. Trends.* 24(8):590-604.

Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe BV. 2004. Fresh produce: a growing—cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.* 67(10):2342-2353.

Sivapalasingam, S., E. Barrett, A. Kimura, S. Van Duyne, W. De Witt, M. Ying, A. Frisch, Q. Phan, E. Gould, P. Shillam, V. Reddy, T. Cooper, M. Hoekstra, C. Higgins, J. P. Sanders, R. V. Tauxe, and L. Slutsker. 2003. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Newport infection linked to mango consumption: impact of water-dip disinfection technology. *Clin. Infect. Dis.* 37:1585–1590.

Smoot ML, Pierson MD. 1997. Microorganismos indicadores y criterios microbiológicos. En: *Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras*, Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ(eds). Acriba. España, pp. 69-82.

Solís SL, Heredia N, García S. Determinación de microorganismos indicadores de calidad sanitaria y *Campylobacter* spp en muestras de pollo crudo. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria 2008 (Puebla, Pue. Octubre 2008).

Solomon EB, Pang HJ, Matthews KR. 2003. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce plants following spray irrigation with contaminated water. *J. Food Prot.* 66:2198-2202.

Solomon EB, Potenski CJ, Matthew KR. 2002. Effect of irrigation method on transmission to and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *J. Food Prot.* 65(4):673-676.

Stanley K, Jones K. 2003. Cattle and sheep farms as a reservoir of *Campylobacter*. *J. Appl. Microbiol.* 94:104-113.

Steele M, Mahdi A, Odumeru J. 2005. Microbial assessment of irrigation water used for production of fruit and vegetables in Ontario, Canada. *J. Food Prot.* 68(7):1388-1392.

Stringer SC, Plowman J, Peck MW. 2007. The microbiological quality of hot water-washed broccoli florets and cut green beans. *J. Appl. Microbiol.* 102:41-50.

Strong DH, Canada JC, Griffiths BB. 1963. Incidence of *Clostridium perfringens* in american foods. *Appl. Microbiol.* 11:42:44.

Sumathi S, Friedman CR, Cohen LR, Tauxe RV. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.* 67:2342-2353.

SVETA. s.f. Enfermedades Transmitidas por los Alimentos. [Internet]. Disponible en sitio de red: <http://www.msds.gov.ve/ms/Boletines/SVETA.pdf> [Revisado el día 16 abril 2008].

Tambekar DH, Mudhada RH. 2006. Bacteriological quality of salad vegetables sold in Amravati city (India). *J. Biol. Sci.* 6: 28-30.

Tauxe R, Kruse H, Hedberg C, Potter M, Madden J, Wchsmuth K, 1997. Microbial hazards and emerging issues associated with fresh produce: a preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. *J. Food Prot.* 60:1400-1408.

Techlink, 2001. Rapid detection of pathogens may improve food and water safety for all. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://techlink.msu.montana.edu/articles/softray.html>. [Revisado el día 20 de mayo 2009].

Terragno R, Caffer MI, Binsztein N. Manual de procedimientos. aislamiento, identificación y caracterización de *Shigella*. WHO Global Salm Surv [internet] Disponible en el sitio de red:

<http://www.panalimentos.org/salmsurv/file/manuales/Manual%20Shigella%201-02-07.pdf> [Revisado el día 15 de octubre 2008].

Tong YL, Labbe R. 2003. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. Appl. Environ. Microbiol. 69:1642-1646.

Török T, King D. 1991. Comparative study on the identification of food-borne yeast. Appl. Environ. Microbiol. 57(4):1207-1212.

Torres TT, Trapaga Y. 2003. Seguridad alimentaria, Seguridad Nacional. Plaza y Valdés: España, pp 123-140.

Townsend DE, Irving RL, Naqui A. 1998. Comparison of the simplate coliform and *Escherichia coli* test with petrifilm, three-tube MPN, and VRBA+MUG methods for enumerating coliforms and *E. coli* in food. J. Food Prot. 61:444-449.

Turkey HB, 1970. The leaching of substances from plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 21:305-324.

Ukuku DO, Fett WF. 2001. Relationship of cell surface change and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind. J. Food Prot. 65:1093-1099.

Ukuku DO, Fett WF. 2004. Method of applying sanitizers and sample preparation affects recovery of native microflora and *Salmonella* on whole cantaloupe surface. J. Food Prot. 67(5): 999-1004.

Viswanathan P, Kaur R. 2001. Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables fruits and sprouts. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 203:205-213.

Wang H, Wei L, Feng H, Luo Y. 2007. Modeling of the effect of washing solution flow conditions on *Escherichia coli* O157:H7 population reduction on fruit surfaces. *J. Food Prot.* 70(11):2533-2540.

Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J. Appl. Microbiol.* 83:727-736.

Warren BR, Parish ME, Schneider KR. 2006. *Shigella* as a foodborne pathogen and current methods for detection in food. *Crit. Review Food Sci. Nutr.* 46:551-567.

Warren BR, Yuk HG, Schneider KR. 2007. Survival of *Shigella sonnei* on smooth tomato surfaces, in potato salad and in raw ground beef. *Int. J. Food. Microbiol.* 116:400-404.

Warriner K, Ibrahim F, Dickinson M, Wright C, Waites WM. 2003. Interaction of *Escherichia coli* with growing salad spinach plants. *J. Food. Prot.* 66(10):1790-1797.

Wells JM, Butterfield JE, 1999. Incidence of *Salmonella* on fresh and vegetables affected by fungal rots or physical injury. *Plant Disease.* 83:722-726.

Wells JM, Butterfield JE. 1997. *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace. *Plant Disease.* 81(8):867-872.

Wen Q, McClane BA. 2004. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in american retail foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5):28685-2691.

Wills B, McGlasson B, Graham D, Joyce D. 1998. Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales. Acribia. España, pp. 1-5.

Wilson M, Lindow SE. 1994. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. Appl. Environ. Microbiol. 60:4468-4477.

Wright SL, Carver DK, Siletzky RM, Romine S, Morrow WEM, Kathariou S. 2008. Longitudinal study of prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from turkeys and swine grown in close proximity. J. Food. Prot. 71(9):1791-1796.

Wu FM, Doyle MP, Beuchat LR, Wells JG, Mintz ED, Swaminathan B. 2000. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. J. Food Prot. 63(5):568-572.

Yoda K. y Uchimura M. 2006. An outbreak of *Campylobacter jejuni*; food poisoning caused by secondary contamination in cooking practice at high school. Jpn. J. Infect. Dis. 59:408-409.

Zhang S, Farber JM. 1996. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. J. Food Microbiol. 13:311-321.

Zucca I, Bougeois CM, Mescle JF. 1998. Microbiología alimentaria Volumen 1. Acribia: España, pp. 487-677.

RESUMEN CURRICULAR

Mayra Alejandra Gómez Govea

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

**Tesis: EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE FRUTAS Y HORTALIZAS
EXPENDIDOS EN LA ZONA METROPOLITANA DE MONTERREY N.L.,
MEDIANTE TECNOLOGÍAS RÁPIDAS"**

Campo de Estudio: Inocuidad Alimentaria

Datos Personales: Nacida en San Luis Potosí, S.L.P. el 14 de abril de 1984, hija de Ma.
Alejandrina Govea Ruiz y Mario Gómez Núñez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, grado obtenido
Químico Farmacobiólogo en 2006.